

## Tesis de Posgrado

# Análisis de vestigios inorgánicos para caracterización, diagnóstico y evaluación de contaminación acuática

Tudino, Mabel Beatriz

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Tudino, Mabel Beatriz. (1995). Análisis de vestigios inorgánicos para caracterización, diagnóstico y evaluación de contaminación acuática. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2789\\_Tudino.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2789_Tudino.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Tudino, Mabel Beatriz. "Análisis de vestigios inorgánicos para caracterización, diagnóstico y evaluación de contaminación acuática". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2789\\_Tudino.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2789_Tudino.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ANALISIS DE VESTIGIOS INORGANICOS  
PARA CARACTERIZACION,  
DIAGNOSTICO Y EVALUACION  
DE CONTAMINACION ACUATICA**

**TRABAJO DE TESIS PRESENTADO PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS**

**MABEL BEATRIZ TUDINO**

1995

152

*Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de  
Análisis de Trazas del Departamento de Química Inorgánica,  
Analítica y Química Física de la Facultad de Ciencias Exactas  
y Naturales con la dirección del Profesor Dr. Osvaldo E. Troccoli.  
Se presenta para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires.*

*A mi esposo e hijo,  
quienes "acompañaron"  
la redacción de este trabajo con  
su estímulo constante y  
su paciencia infinita.*



### **AGRADEZCO:**

-A mis compañeros del Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, quienes con su cordialidad de todas las mañanas, han hecho más llevadero el trabajo.

-A los Lic. Jorge Stripeikis y Liliana d'Huicque por su amistad, calidez y apoyo permanente a nivel humano y profesional.

-A los becarios del Laboratorio de Análisis de Trazas: Francisco Andrade, Facundo Fernández, Pablo Costa y Fernando Iñon y de INQUIMAE: Pablo Luna, por los "buenos" y "nuevos" aires.

### **AGRADEZCO tambien:**

-A las autoridades del Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física por el lugar de trabajo.

-A INQUIMAE y GTZ por el equipamiento con el que se realizaron gran parte de las medidas.

-Al Servicio de Hidrografía Naval y al Dr. Carlos Bonetto (Instituto Ringelet) por el asesoramiento y la colaboración en la toma de muestras.

-Al Servicio de Análisis a Terceros de los Laboratorios de Análisis de Trazas, Fundación Ciencias Exactas y Naturales y UBACyT por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

**AGRADEZCO** muy especialmente:

Al Dr. Osvaldo E. Troccoli, consejero de estudios y director de tesis, por el tiempo y esfuerzo invertidos en enseñarme a establecer con claridad los objetivos del trabajo y "reconocer" la mejor manera de alcanzarlos.

Algunos resultados obtenidos en ocasión de este estudio han sido difundidos ó enviados para su difusión, a saber:

-Improvements in the flow through determination of nitrate and nitrite in natural waters. Applications to riverine waters from Argentina.

F.Fernández, M.Tudino and O.Troccoli.

En prensa

-Flow dissolution of diphenylcarbazide for Cr(VI) determinations.

F.Andrade, M.Tudino and O.Troccoli.

Enviado

**Si el hombre es un gesto  
el agua es la historia,**

**si el hombre es un sueño  
el agua es el mundo,**

**si el hombre es recuerdo  
el agua es la vida,**

**si el hombre es un niño  
el agua es Paris,**

**si el hombre la pisa  
el agua salpica,**

**cuídala  
como cuida ella de ti.**

**Brinca, moja, vuela, lava,  
agua que vienes y vas.  
Río, espuma, lluvia, niebla,  
nube, fuente, hielo, mar.**

**Agua, barro en el camino,  
agua que esculpes paisajes,  
agua que mueves molinos,  
agua que me da sed nombrarte.  
Agua que le puedes al fuego,  
agua que agujereas la piedra,  
agua que estás en los cielos  
como en la tierra.**

# INDICE TEMATICO

---

## 1 INTRODUCCION

Definiciones: Contaminación, Sustancias Nocivas.	
Sustancias Tóxicas	2
Criterios de selección de sustancias nocivas para el análisis.	
metales pesados	4
Análisis de vestigios y especiación.	5
Etapas del análisis	6

---

---

## 2 ETAPAS PREVIAS AL ANALISIS

2.1.	Muestreo	9
2.1.1.	Aspectos estadísticos	10
2.1.2.	Aspectos filosóficos	13
2.1.3.	Planificación	14
2.1.4.	Protocolo de muestreo	17
2.2	Almacenamiento y preservación de muestras	20
2.2.1.	Materiales de almacenamiento	20
2.3.	Acondicionamiento de muestras	22
2.4.	Solubilización de problemas sólidos	23
2.4.1.	Solubilización asistida por microondas	26
2.4.2.	Teoría y diseño de digestores	27
2.4.3.	Aspectos teóricos del calentamiento por microondas	27
2.4.4.	Selección del tamaño de muestra	28
2.4.5.	Características del calentamiento por microondas	29
2.4.6.	Instrumentación	30
2.4.6.1.	Componentes básicos	30
2.4.6.2.	Materiales	30
2.4.6.3.	Recipientes	30
2.4.6.4.	Tipos	31
2.4.6.5.	Ventajas	32
<i>Tablas y Figuras</i>		34

---

---

### 3 LA ETAPA DE VALORACION

3.1.	Parámetros de mérito y su rol en la calidad	38
3.1.1.	Trazabilidad de resultados	43
3.1.2.	Validación de resultados y evaluación de trazabilidad	46
3.1.2.1.	Comparación con valores de referencia	49
3.1.2.2.	Comparación de medias de dos conjuntos de resultados	50
3.1.2.3.	Comparación de dos conjuntos de resultados y aplicación de la regresión lineal	52
3.1.3.	Selección de parámetros de calidad	53
3.2.	Aspectos estadísticos del análisis de vestigios	55
<i>Tablas y Figuras</i>		58

---

### 4 ATOMIZADORES SIN LLAMA EN EAA

4.1.	Atomizadores de llama	62
4.1.1.	Características y estructura	63
4.1.2.	Radiación proveniente de la llama	65
4.1.3.	Introducción de muestra	68
4.1.4.	La llama como entorno	70
4.2.	Atomizadores electrotérmicos	74
4.2.1.	Diferentes tipos	75
4.2.2.	Mecanismos de atomización	78
4.2.3.	Distribución de átomos	80
4.2.4.	Zona de temperatura estabilizada	85
4.2.5.	Modificadores de matriz	88
4.3.	Generación de vapor	90
4.3.1.	Reacción química	92
4.3.2.	Transferencia de masa	93
<i>Tablas y Figuras</i>		98

---

---

## **5 SISTEMAS DE ANALISIS POR INYECCION EN FLUJO CONTINUO (FIA)**

5.1.	Fundamentos	108
5.2.	Principios de funcionamiento	120
5.3.	Variables que afectan la señal: aspectos teóricos relacionados con el fenómeno de dispersión	122
5.3.1.	Influencia del volumen de muestra	127
5.3.2.	Influencia del diámetro ya longitud del reactor y de la velocidad de flujo	129
5.3.3.	Influencia de la geometría del reactor	131
5.4.	Distintas configuraciones FIA	132
<i>Tablas y Figuras</i>		136

---

---

## **6 PARTE EXPERIMENTAL**

6.1.	Aparatos y Reactivos (ver apéndice)	
6.2.	Procedimiento	141
6.2.1.	Colección y preservación de muestras	141
6.2.2.	Mineralización de sólidos	142
6.2.2.1.	Discusión de resultados	145
6.2.3.	Análisis de vestigios metálicos	
6.2.3.1	Cromo Total	147
6.2.3.2.	Cromo hexavalente	151
6.2.3.3.	Cadmio	157
6.2.3.4.	Plomo	161
6.2.3.5.	Cobre y Cinc	168
6.2.3.6.	Arsénico y Mercurio	171
6.2.4.	Análisis de concomitantes	175
6.2.4.1.	Especiación simultánea de nitratos y nitritos	175
<i>Tablas y Figuras</i>		183

---



---

## **7 APLICACIONES: ZONA COSTERA DEL RIO DE LA PLATA**

7.1.	Introducción	189
7.2.	Muestreos exploratorios	191
7.2.1.	Area de estudio	191
7.2.2.	Resultados preliminares	192
7.3.	Monitoreo de metales pesados	194
7.3.1.	Area de estudio	194
7.3.2.	Resultados	194
7.3.3.	Discusión	200
7.3.4.	Conclusiones	203
<i>Tablas y Figuras</i>		204

---

## **APENDICES**

Del capítulo 4	205
Del capítulo 6	214

---

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	218
---------------------	-----

---



# **CAPITULO 1**

## Capítulo 1

### INTRODUCCION

La palabra **contaminación** parece haberse transformado en los últimos años en una palabra "de moda" en los ambientes no académicos ó científicos. Expresiones como: "este río esta contaminado", ó, "la mano del hombre ha dañado severamente ese ecosistema acuático", ó, "los niveles de cromo de aquel arroyo muestran la influencia antropogénica", etc.; son, la mayoría de las veces emitidas y difundidas por quienes carecen de conocimientos adecuados como para realizar esta valoración.

La primer pregunta que surge es: **¿qué significa contaminación?**. Es una palabra que está relacionada con el concepto de cambio, sea este provocado ó no por el hombre. Se puede definir como "la resultante de una modificación producida en un ambiente determinado de modo tal que este último se vea perjudicado, asociando este perjuicio a la posibilidad que tiene el medio para absorber o no este cambio"<sup>1</sup>. La definición de contaminación ó polución que surge del *A-Z of Environmental Pollution*<sup>2</sup>, coincidente con la del *Glosario sobre Ecología y Medio Ambiente*<sup>3</sup> dice: "Es la penetración de una sustancia nociva en un organismo vivo provocando su deterioro".

Las **sustancias nocivas** ó peligrosas son sustancias que están presentes naturalmente en el ambiente o bien son introducidas en él, y provocan efectos adversos en microorganismos, plantas, animales y humanos. Estas sustancias nocivas tienen varios orígenes: naturales (originados por ejemplo por catástrofes como erupción de volcanes ó inundaciones); antropogénicas (causadas por los

seres humanos como en el caso de uso de metales pesados ó pesticidas); biológicas (causadas por procesos biológicos como las aflatoxinas producidas por los hongos), etc.

Estas sustancias nocivas pueden causar daño solas o bien en su relación con otras sustancias pudiendo, incluso, aumentar su peligrosidad. Bajo ciertas condiciones estas sustancias nocivas pueden transformarse en **sustancias tóxicas**, dependiendo de las características de la sustancia y del ecosistema. La inocuidad, o si se quiere toxicidad de una determinada sustancia se relaciona con: su concentración en el medio; su facilidad de absorción por parte del organismo vivo ó biodisponibilidad (que depende de los procesos de distribución de la sustancia y de su forma química), sus características de transformación en el organismo vivo (biotransformación) y su facilidad de descomposición en el ambiente (biodegradación), ó sea su estabilidad ó persistencia.

De lo que antecede, podemos ver que ante la presencia de una sustancia peligrosa en términos de estabilidad, persistencia y biodisponibilidad, la principal medida a tomar es la de controlar la **cantidad de sustancia** que puede acceder al organismo vivo. Este hecho es esencialmente de naturaleza **analítica**, y en particular pertenece al dominio de la **Química Analítica**.

Para poder evaluar mas tarde la importancia del hallazgo, se hace necesario estudiar los procesos físicos y químicos a través de los cuales los compuestos "no deseados" se distribuyen en el ambiente y terminan alojados en un organismo receptor.

La distribución y especiación de tóxicos en un ecosistema acuático está determinada por la presencia de elementos que son habituales en la corteza terrestre y de ligandos que están generalmente asociados a ellos a los que

llamaremos **concomitantes**. Este hecho obliga a estudiar a las sustancias nocivas en relación con su entorno para conocer su distribución y cuantificar, en presencia de estos concomitantes, las distintas formas químicas del compuesto.

Son muchas las sustancias nocivas que se introducen en el ambiente como resultado de la actividad humana, ya sea directa ó indirectamente, con intención ó sin ella. Estas sustancias pueden ser compuestos químicos de naturaleza orgánica ó inorgánica, de origen sintético ó natural. Entre ellos, hemos seleccionado los compuestos inorgánicos, específicamente los **metales pesados**, dado su imposibilidad de degradación, su estabilidad, su persistencia y por ende su toxicidad aún, a muy bajas concentraciones.

Se define a los metales pesados como aquellos que tienen una densidad mayor que  $4,5 \text{ g/cm}^3$ . Muchos son elementos traza esenciales para el hombre como Fe, Co, Ni, Mn, Zn, Cu, Mo, Se, etc, de ocurrencia natural, mientras que otros son tóxicos incorporados por la mano del hombre como Cd, Hg y Pb. Los metales pesados seleccionados para este trabajo cumplen con las siguientes pautas<sup>4</sup>:

- a) Se extraen y utilizan en la industria local en cantidades razonables
- b) Se utilizan y/o desechan en lugares donde el público puede tener contacto con ellos.
- c) Son tóxicos para los seres humanos, aún en concentraciones muy bajas.
- d) Provocan transformaciones de significación en los ciclos biológicos y geoquímicos.
- e) Su acción nociva es potenciada por los componentes habituales del sistema en estudio.

Este trabajo enfoca el estudio de contaminación desde el punto de vista **analítico**, seleccionando aquellos metales pesados peligrosos que mas seriamente impactan el ambiente a nivel local, y en un medio particular, **el agua**.

Algunas preguntas surgen ineludiblemente: ¿es ésta una química analítica especial?, ¿con características diferentes a la ya conocida?, ¿con otras condiciones de contorno?. La respuesta se puede sintetizar de la siguiente manera: es la química analítica que permite realizar la detección y valoración de **vestigios** de contaminantes en la forma química en la que se encuentran en el ambiente, denominada de ahora en mas **especiación**, en presencia de los **concomitantes** típicos de los medios naturales (cuya concentración también deberá conocerse o evaluarse), con alta **frecuencia de análisis** debido a la cantidad de muestras necesarias para calificar el riesgo ambiental, recurriendo a técnicas **automatizadas** con una mínima posibilidad de contaminación externa. Esto es: preconcentrar, separar y cuantificar en línea con alta frecuencia de muestreo.

Esta claro, que desde el presente trabajo no podemos encarar un estudio analítico de contaminación que permita cuantificar cualquier contaminante en cualquier medio natural con el uso de técnicas analíticas universales, si las hubiere. Nuestro objetivo es mostrar el trabajo innovador realizado en el análisis de algunos metales en aguas naturales usando técnicas espectroscópicas acopladas en algunos casos a sistemas automáticos de introducción de muestras, para realizar diagnóstico valedero de contaminación por metales en un ecosistema acuático particular, a partir de datos confiables que permitan luego una evaluación correcta del problema.

La obtención de datos confiables no es solamente un problema del análisis propiamente dicho sino de otros factores tanto o más relevantes que el análisis mismo. Los aspectos a considerar implican: obtener una **muestra representativa** del problema, **preservarla** evitando la contaminación externa y los cambios en la forma química del tóxico en el proceso de muestreo, analizar **vestigios** (en algunos casos ppb ó ppt), en presencia de **interferencias** que afectan la **performance** de la técnica analítica a usar (por ejemplo en el caso del límite de detección interferentes o contaminantes pueden dar lugar a obtener valores espúreos como falsos negativos o falsos positivos) y **convalidar** el dato obtenido, para luego **evaluar** los resultados. Además, cuando el problema es sólido, y se aplica una técnica analítica de vía húmeda, es necesario diseñar los métodos de mineralización y acondicionamiento de modo de hacer factible la posterior valoración del tóxico<sup>5</sup>.

El trabajo del químico analítico incluye las siguientes etapas:

**1.Muestreo**

**2.Preservación Transporte**

**3. Solubilización**

**4.Análisis**

**5.Evaluación de resultados**

¿Qué queremos decir en cada caso?

1.-Obtener una muestra representativa de la población y de acuerdo al problema en estudio.

2.- Adoptar un procedimiento de almacenamiento de muestras no contaminante que no modifique la forma química del compuesto y no altere la distribución del mismo. (Por ejemplo, la preservación de aguas para el análisis de metales totales, metales en suspensión ó metales disueltos es diferente y tiene que estar perfectamente establecida antes de llegar al campo.



- 3.-Transformar, cuando fuera necesario, los componentes de la muestra sin contaminación externa y completa recuperación del analito.
- 4.-Cuantificar las distintas especies en presencia de interferencias teniendo en cuenta las interacciones analito-matriz, convalidar la exactitud del resultado y adoptar técnicas de fraccionamiento cuando fuere necesario (separación, preconcentración, especiación, etc.)
- 5.-Coordinar la interacción con otras disciplinas como toxicología, medicina, ingeniería, economía, etc. para evaluar resultado y proponer, eventualmente, correctivos que surjan del consenso.

Cada una de las etapas que permiten obtener un dato analítico válido están íntimamente relacionadas. Un muestreo pobre y una preservación y transporte de muestra inadecuados, conducen a un dato analítico sin valor. Los errores que se cometan en cada una de las etapas individuales ocurren separadamente, por lo que no se pueden corregir en la etapa siguiente. Se puede concluir que cada uno de los pasos señalados tiene que ser cuidado con toda rigurosidad para cumplir con los objetivos de nuestro trabajo.

El análisis de vestigios es inevitable cuando se trata de diagnosticar contaminación por metales pesados dado que, muchos de ellos, son tóxicos aún a bajísimas concentraciones. La definición de vestigio es fenomenológica porque depende de la cantidad mínima detectable con la técnica analítica particular, en nuestro caso estamos hablando del ng/ml ó menos. Este mínimo detectable se ve afectado por la presencia de los concomitantes de ocurrencia natural en los sistemas acuosos, a los que nos refiriéramos más arriba.

La valoración de los concomitantes naturales en el sistema acuático permitirá por un lado, predecir la distribución y especiación de los metales pesados en el sistema acuático<sup>6</sup> y relacionarlas con la disponibilidad que de éstos tóxicos tengan los organismos vivos<sup>7</sup>, y por el otro, conocer como se verán afectadas las bondades de la técnica analítica seleccionada en ocasión de trabajar con muestras reales. O sea que estas bondades (parámetros de mérito) que caracterizan a una determinada técnica analítica como: sensibilidad, límite de detección, ámbito dinámico lineal, precisión, exactitud, frecuencia de análisis, etc., se redefinen para cada muestra ambiental en particular.

El parámetro de mérito ó de calidad a optimizar en cada análisis, es también diferente y dependerá del problema que se plantee. A modo de ejemplo: valorar mercurio en agua de mar significa mejorar el límite de detección, hacer un barrido del nivel de sodio en un río sometido a grandes cambios de salinidad implica expandir el ámbito dinámico de linealidad, seleccionar el mejor procedimiento de remediación de un efluente que contiene plomo apunta a mejorar la sensibilidad, y/o el límite de detección si el proceso decontaminante funciona.

Resumiendo, las experiencias realizadas en el presente trabajo y que se aplicaron al sistema acuático zona costera del Río de la Plata, fueron concebidas teniendo en cuenta la optimización de cada uno de los pasos que lleva a la obtención de datos valederos, por lo que los fundamentos de cada uno de ellos serán presentados en los capítulos siguientes.



# **CAPITULO 2**

## Capítulo 2

### ETAPAS PREVIAS AL ANALISIS

#### 2.1. Muestreo

Tal como se manifestó en la introducción, entendemos como muestreo al conjunto de operaciones que conducen a la obtención de una porción representativa del universo a caracterizar. En los estudios de contaminación, la primer etapa a tener en cuenta es conocer la serie de procedimientos que llevan a la correcta recolección de las muestras dado que como se trata de identificar ó cuantificar cantidades muy pequeñas de analito, la posibilidad de error aumenta considerablemente. El **muestreo** así encarado es un tema tan importante como el análisis mismo (ó quizás mas) y lo suficientemente complejo como para poder establecer pautas generales aplicables a cualquier muestra y a cualquier especie química a analizar. No obstante esto, existen una serie de principios fundamentales que deben respetarse para llevar a cabo un buen muestreo en lo que hace a la calidad y cantidad de muestra.

El analista debe tener siempre la información preliminar que le permite entender que significa y cuan importante es respecto del todo, la pequeña muestra que recibe en el laboratorio y la aún menor que aísla para realizar la valoración. Con esto queremos decir que deberá conocer: i) la importancia del muestreo, ii) su "background" estadístico; iii) los métodos generales a través de los cuales se realiza el muestreo para el material que estudia; iv) el correcto transporte y almacenamiento de muestras; v) los peligros que pueden conducir a errores sistemáticos (en un solo sentido); vi) el uso que se vaya a hacer del análisis y vii) el lugar donde encontrar información adicional.

### 2.1.1. Aspectos estadísticos del del muestreo.

Una muestra ideal es aquella que tiene las mismas propiedades intensivas que la porción de material de la cual fue aislada. En la práctica, una muestra es satisfactoria si las propiedades que se investigan tienen se corresponden con el todo dentro de los límites que impone la propia naturaleza del test.

El muestreo se puede realizar para ensayos por atributos ó por variables. El test por atributos, pasa ó no pasa, no es de poco interés para el químico analítico. En cambio, aquel que determina en que cantidad el ítem se aparta del estándar deseado adquiere especial significación.

En la necesidad de prologar la base matemática del muestreo veamos algunas definiciones.

Los términos **población** ó **universo** se usan para describir el grupo total y distinguirlo de uno ó mas de sus partes constituyentes. Es también muy importante distinguir entre **porciones** de la misma población y porciones de dos ó mas poblaciones. A modo de ejemplo, si las determinaciones de la concentración de Pb en aguas del Río de la Plata fueran combinadas con determinaciones de la concentración de Pb en el Río Paraná asumiendo que son la misma población, nuestras conclusiones diferirán mucho de las que obtendríamos de tratarlos como dos poblaciones separadas.

Una **muestra** es la **porción total** de **una** sola **población** que se toma de manera tal que la represente. Por ejemplo, si extraigo una gota de agua de río, la muestra no es una porción de esa gota sino la gota entera.

En lo que sigue, asumiremos que la propiedad a ser investigada (por ejemplo cantidad de Pb) tiene una distribución normal en la población. Esto quiere decir, que si se determinara Pb en todos los elementos individuales ó porciones discretas de la población, y se graficaran las frecuencias con que cada valor es obtenido (ordenadas) en función de dichos valores (abcisas), se obtendría una

campana. Su forma exacta, no obstante, dependerá del valor medio de la propiedad que se mide y de la variabilidad de la propiedad en la población en particular que estamos investigando.

La ecuación que describe la curva es:

$$y = \frac{1}{\sigma (2\pi)^{1/2}} \exp - \frac{|(x - \mu)^2|}{2\sigma^2} \quad (2.1);$$

donde  $y$  es la varianza de la población ó lo que es lo mismo el promedio de los cuadrados de las desviaciones de la media,  $\sigma$  es la desviación estándar de la población ó la raíz cuadrada de la varianza,  $\mu$  es la media aritmetica de la propiedad en la población y  $x$  es un valor individual de la propiedad en una porción discreta.

Es imposible determinar de unas pocas observaciones si una población tiene ó no una distribución normal a menos que la diferencia respecto de la normalidad sea muy grande. Afortunadamente, las muestras al azar conducen a medias aritméticas ( $\bar{x}$ ) que se aproximan a una forma normal aún cuando la población de la cual provienen no sea normal.

Sin tener en cuenta errores experimentales, los valores obtenidos de una muestra de  $n$  elementos que se tomaron al azar de una población que sigue una ley de distribución normal, se distribuirán alrededor de  $\mu$  con una desviación  $s_x = \sigma/\sqrt{n}$ . En general  $\mu$  y  $\sigma$  no se conocen pero  $s$  y  $\bar{x}$  pueden utilizarse como una estimación de ambos. (Estimadores de precisión y exactitud respectivamente). Es obvio, que valores de  $n$  grandes conducirán a valores de  $\bar{x}$  que se aproximen fuertemente a  $\mu$  pero en la práctica es necesario considerar el costo del muestreo y de realizar un gran número de observaciones.

El error cometido en el método de análisis se debe sumar a la propia variabilidad del procedimiento muestreo. Para calcular el error total se usa la varianza  $V$  ó  $\sigma^2$  que es un estimador aditivo a diferencia de la desviación estándar. Esto es, si  $\sigma^2$  representa la varianza de la propiedad y  $\sigma_a^2$  la del análisis, los valores obtenidos de las muestras se distribuirán alrededor de  $\mu$  con una varianza igual a  $\{\sigma^2 + \sigma_a^2\}/n$ .

En general el muestreo representativo suele ser mas utilizado que el muestreo al azar porque disminuye el número de observaciones. Cuando la población a ser muestreada es de naturaleza tal que se puede dividir en un número de grupos ó sectores y entonces, se puede tomar un incremento muestral(cantidad de material preestablecido) al azar de cada grupo ó sector en proporción al tamaño de dicho grupo ó sector. El valor promedio de la propiedad  $x$  en las muestras tendrá una varianza alrededor de  $\mu$  que será igual a:

$$\frac{(n_1s_1^2 + n_2s_2^2 + n_3s_3^2 + \dots)}{n^2} \quad (2.2):$$

donde  $s_1^2$ , etc., representan las varianzas de la propiedad en el grupo ó sección;  $n_1$ ; etc., representan los tamaños de los incrementos de modo tal que  $n_1 + n_2 + n_1 + \dots$  es el tamaño de la muestra.

Se puede mostrar que utilizando un muestreo representativo se puede lograr una reducción en el tamaño de muestra respecto del muestreo al azar sin que por esto se sacrifique la validez de los resultados obtenidos.

Veamos el siguiente ejemplo: Se tiene una población de 1000 botellas de ácido sulfúrico. Datos obtenidos de muestras de lotes previos muestran un valor para  $s$  de 2% lo que se puede usar como estimador de  $\sigma$ . Si se asigna como objetivo una desviación estándar de 0.5% para el proceso de muestreo, a través de la ecuación  $s_x = \sigma/\sqrt{n}$  se obtiene que se analizarán 16 botellas de las 1000 enviadas

seleccionadas al azar entre el lote completo. Si por el contrario, asumimos que las 1000 botellas provienen de tres sectores distintos de 200 ( $0.2n$ ), 300 ( $0.3n$ ) y 500 ( $0.5n$ ) respectivamente y decimos (lo que es bastante razonable) que la varianza de cada porción o "batch" será menor que la varianza total, supongamos  $1.0^2$  en lugar del  $2.0$  asumido como  $\sigma$  en el primer caso, y asignamos el mismo valor de  $(0.5)^2$  a la varianza del muestreo, obtenemos de aplicar la ecuación 2.2, un resultado de  $n=4$ . Se podría tomar una botella de cada uno de los grupos pequeños y dos del grupo grande.

El ejemplo demuestra que es posible realizar reducciones en el tamaño de muestra realizando muestreos representativos en lugar de al azar sin sacrificar nuestro objetivo de calidad.

### **2.1.2. Aspectos filosóficos del muestreo**

Mas allá de los aspectos técnicos vinculados al muestreo, podemos considerar una serie de principios ó pautas generales enunciados en el libro de Keith<sup>8</sup> que nos dan un enfoque mas filosófico del tema:

a) Las muestras que no son representativas de la población en estudio son de poca ó ninguna utilidad.

b) La recolección de muestras realizada con procedimientos poco rigurosos conduce a muestras no representativas que contribuyen a la incertidumbre del resultado analítico.

c) Los errores de muestreo y de análisis son completamente independientes, de modo que los errores del muestreo no se subsanan a través del análisis (por ejemplo a través del uso de blancos de laboratorio ó bien de muestras de control.

d) Los errores de muestreo se corrigen remuestreando y volviendo a analizar.



Si además asumimos que la contaminación externa es una fuente permanente de error en cualquier tipo de determinación de vestigios y particularmente en el caso de mediciones ambientales, y que en la mayoría de los procedimientos de muestreo y análisis se presentan numerosas oportunidades para incorporar sustancias extrañas a la muestra a través de equipos de muestreo, recipientes de almacenamiento, reactivos de preservación y/o acondicionamiento, transporte al laboratorio, preparación de las muestras para el análisis (por ejemplo solubilización) y el proceso analítico propiamente dicho<sup>9-11</sup>, surge la necesidad de planificar previamente el muestreo y el análisis para minimizar los errores que puedan cometerse, y controlar la calidad de cualquiera de las operaciones involucradas<sup>12</sup>.

### **2.1.3. Planificación del muestreo**

Antes de proceder al muestreo es imprescindible precisar los **objetivos globales** del mismo, esto es: ¿qué se espera de los datos obtenidos?, ó ¿para qué se ha encomendado este estudio?.

Los objetivos globales pueden ser **cualitativos** ó **cuantitativos**. Los primeros no contienen datos numéricos pero reflejan decisiones "políticas" a ser tomadas. Se podría ejemplificar de la siguiente manera: ¿que acción se toma si las muestras tomadas en sitios control (supuestamente no poluídos) contienen cantidades apreciables de contaminantes?. Respuestas posibles: descartar los datos y seguir adelante, asumir el problema y remuestrear ó tomar como válidas al momento de evaluar resultados sólo aquellas muestras que contengan cantidades que superen el nivel de "background" ó, sencillamente redefinir los sitios control.

Los objetivos cuantitativos contienen datos como por ejemplo el límite de detección y la sensibilidad requerida para los ensayos, la desviación estándar,

desviación estándar relativa, el porcentaje de recuperación, el valor de LD50 para el tóxico en cuestión, etc..

Estos objetivos globales son siempre una situación de compromiso entre las necesidades reales y el costo del muestreo y el análisis, que ubican al proyecto en términos más realistas.

Otra manera de enfocar los objetivos de un estudio ambiental, es dividirlos en términos del enfoque que se le dé al muestreo en **exploratorios** y de **monitoreo**<sup>13</sup>.

El muestreo exploratorio se debe diseñar para obtener información preliminar sobre el problema a encarar y puede contener, entre otros datos, información sobre el sitio a estudiar y el tipo de sustancia ó sustancias que van a ser analizadas..el orden de concentración en el que se encuentran y su variabilidad espacial. En el diseño del patrón de muestreo exploratorio intervienen diversas disciplinas: la estadística, la geología, la biología, la química, etc.. Cada una de ellas debe aportar elementos de juicio que permitan conformar una adecuada aproximación al problema.

El muestreo de monitoreo proporciona información sobre la variación de las concentraciones de un analito específico durante un período de tiempo particular. En general, un muestreo de monitoreo es más efectivo si viene precedido de un muestreo exploratorio, ó si existen datos históricos sobre los analitos de interés en el lugar de muestreo. En este tipo de muestreo también se requiere una aproximación multidisciplinaria, pero con otro sesgo.

También se puede clasificar al muestreo desde sus características, más que desde sus fines, así podemos mencionar a tres tipos básicos de muestreo (que se

seleccionan en función de los objetivos globales del proyecto): **aleatorio** ó "al azar", **sistemático** ó estratificado y "**de juicio**" ó específico. También se pueden utilizar combinatorias primarias como por ejemplo, sistemático específico, sistemático al azar ó específico aleatorio, dependiendo de las necesidades.

El muestreo aleatorio simple, utiliza un **gran número de muestras**, seleccionadas al **azar** con un sesgo **mínimo**, ó sea, sin prejuicios personales del muestreador.

El muestreo sistemático, utiliza un **gran número de muestras**, siguiendo una **grilla** de geometría particular con un sesgo **mínimo**. Diseño experimental del muestreo.

El muestreo de juicio, utiliza un **número de muestras pequeño**, obtenidas en un lugar determinado de acuerdo a la **historia previa** del sitio ó por **juicio visual**, y sesgo **máximo**. Este tipo de muestreo limita el número de muestras a tomar, abaratando costos, y se encara, por ejemplo, cuando existen antecedentes documentados de contaminación en un sitio dado, (bibliografía, "screening" previo, etc.), o bien como resultado de la observación visual que del sitio realiza previamente el muestreador.

Se pueden utilizar también combinatorias primarias, como por ejemplo, un muestreo sistemático con una grilla de geometría definida, puede ser sistemático puro tomando muestras en los nodos ó bien en el centro de cada grilla, o sistemático al azar, por recolección de muestras en cualquier punto de los delimitados por cada sector.

Una vez definido el objetivo, el procedimiento de muestreo a realizar queda acotado, así como la selección del equipamiento, el número de campañas y su frecuencia (cuando corresponda), el número de muestras, su tamaño y el orden en el que deben ser tomadas, la metodología analítica, la calidad del dato y el criterio

de control de calidad. A partir de todas estas condiciones, se elabora el protocolo de muestreo.

#### **2.1.4 El protocolo de muestreo**

Es un documento que contendrá todos los elementos necesarios para asegurar que las muestras obtenidas van a proporcionar las respuestas que se buscan. Sus componentes principales son:

- a) Descripción de los objetivos del muestreo
- b) Detalle del diseño estadístico de muestreo.
- c) Identificación del lugar de muestreo
- d) Identificación de variables físicas, meteorológicas, hidrológicas, etc.
- e) Características del equipo de muestreo..
- f) Características de las muestras.
- g) Preservación
- h) Información sobre los métodos analíticos a ser utilizados.

Donde:

- a) Se indican los objetivos globales del muestreo y el nivel de confianza que deberán tener los datos para poder establecer conclusiones. El tipo de muestreo en términos de objetivos y características.
- b) Se establecerá aquí el diseño estadístico de muestreo, que es fundamental para poder establecer conclusiones respecto de la representatividad de cada muestra, ó sea, para asegurar que los datos obtenidos y tratados representan la matriz que va a evaluarse con el nivel de confianza requerido. Por ejemplo, si la muestra se utilizara para deducir aspectos de una población dada, todos los miembros de la población deberán tener igual posibilidad de ser muestreados.

c) Se debe realizar una visita previa de modo de establecer las características relevantes del lugar. Es muy importante en este punto verificar la posibilidad de acceder a todos los sitios diseñados en el muestreo.

d) Esta información debe estar relevada en el momento de iniciar las actividades de campo. (Es importante notar que a veces, las características del lugar relevado con anterioridad ó bien las variables físicas como por ejemplo las condiciones meteorológicas, cambian en el momento de muestrear obligando a modificar el diseño del muestreo. En estos casos, las decisiones a tomar dependen de la pericia del muestreador. De hecho, las ecuaciones estadísticas son herramientas que ayudan al sentido común pero obviamente, no lo sustituyen).

e) Se debe saber que tipo de equipo de muestreo se va a utilizar, si es compatible con el tipo de muestra y con el tipo de analito (los que deberán ser definidos previamente), que recipientes de almacenamiento se van a utilizar, de qué tamaño y material, qué sustancias químicas que usarán para preservar la muestras, etc.

f) Respecto de las muestras se consignará la cantidad, (para lo cual se deberá conocer el número de sitios de muestreo a los que se sumarán los sitios control), el tipo de muestra, la cantidad de muestra (que dependerá de la metodología analítica y del tipo y número de compuestos a determinar), el número y tipo de blancos, la preparación requerida por las muestras en campo (que dependerá del analito a estudiar y de como se distribuya), las medidas de campo (como pH, oxígeno disuelto y conductividad que condicionan la distribución y movilidad de los compuestos en estudio), etc.

g) Se listarán todos los reactivos que fueran necesarios para la preservación de la muestra, así como los recipientes en los que serán envasadas. Esto supone un conocimiento de cuáles de los métodos analíticos y de las determinaciones que se realizaran en el laboratorio son condicionantes de la forma de preservar la muestra, así como del tamaño y el material del recipiente. Se consignarán los envases

adicionales para cuando se realice filtración en campo, así como el tiempo máximo que puede transcurrir entre el proceso de colección y el análisis químico<sup>14</sup>. Este tema será considerado con mayor detalle mas abajo.

h) Se informarán los métodos analíticos a ser utilizados para cada uno de los analitos, indicando el mínimo volumen de muestra, el mínimo nivel detectable deseado, exactitud y precisión requerida, automatización del análisis, etc. Los métodos analíticos que se seleccionan son la parte fundamental del proceso de planificación de muestreo ya que el químico analítico, que es el responsable de la selección de los mismos, debe conocer con precisión el material y los equipos de los cuales dispone para realizar las determinaciones. Es así como el límite de detección de un método analítico influye sobre el volumen de muestra a tomar para medir ubicándose en el mínimo nivel de cuantificación, así como la selección de los recipientes de almacenamiento y las técnicas de preservación<sup>15</sup>. Es mas, el valor del límite de detección alcanzable con una técnica analítica particular en un medio como el agua, puede modificar incluso los objetivos globales del muestreo. Por ejemplo, los valores a alcanzar cuando se quiere establecer aptitud de aguas para protección de la vida ictícola, son notablemente mas bajos que para el caso de recreación ó riego<sup>16</sup>.

Los muestreos de aguas superficiales para este estudio se realizaron en la zona costera del Río de la Plata, en el tramo comprendido entre Tigre y Berazategui, siguiendo una grilla que involucraba un gran número de muestras, con un doble propósito, exploración y monitoreo. Los tóxicos a muestrear fueron decididos tomando como base datos preexistentes sobre compuestos inorgánicos en el Río de la Plata, aunque estos no correspondieran a zona costera<sup>17</sup>. En los muestreos, se incluyeron algunas muestras extra (fuera de la grilla) seleccionados conforme el juicio de los muestreadores.

Como resultado de los datos obtenidos en la etapa de exploración, se realizaron luego muestreos específicos, acotando el número de analitos "target" y seleccionando los sitios de muestreo que resultaron de mayor interés. Se incorporó en esta etapa, el muestreo de sedimentos.

El posicionamiento geográfico, el diagrama de grilla, el proceso de toma de muestra y acondicionamiento, además de todas las operaciones realizadas en campo, serán descriptas en la parte experimental del capítulo de Aplicaciones.

## **2.2.Almacenamiento y preservación de muestras.**

### **2.2.1 Materiales de almacenamiento y muestreo.**

La contaminación de muestras debida al equipo de muestreo ó al material del envase en que se las almacena hasta la determinación constituye la fuente de mayores errores encontrada en el análisis ambiental. Mayor aún que los errores de los propios procedimientos analíticos, en especial cuando se trata de cuantificación de aguas donde los niveles de concentración a medir son extremadamente bajos.

Si las muestras se ponen en contacto con materiales que pueden reaccionar con ella, ó adsorber las especies de interés, ó desorber un analito ó un interferente por formar estos parte de la composición del material, es seguro que los resultados obtenidos serán incorrectos. O sea que los componentes del equipo de muestreo y de almacenamiento deben ser evaluados en términos de como interactuarán con las especies de interés.

Para seleccionar estos materiales se deben tener en cuenta cuáles son las especies más "lábilas" que serán cuantificadas. En este contexto, la "labilidad" de un analito se mide en función de los parámetros que indicarán una alteración previa a la etapa determinativa, estos son, su concentración y su forma química. Se deben conocer las características de las especies a estudiar en términos de su

reactividad (luz, calor, otros químicos, presencia de microorganismos, etc.), de su volatilidad y de su posibilidad de adsorberse irreversiblemente en los recipientes<sup>18</sup>.

Los equipos de muestreo y almacenamiento deberán ser de materiales compatibles con la matriz y el analito. En particular, para el análisis de contaminantes inorgánicos como en nuestro caso, se trata de evitar el acero inoxidable y el vidrio en los procedimientos de muestreo y envase, sustituyéndose en ambos casos por materiales como Teflon, cloruro de polivinilo o polietileno de baja densidad<sup>14</sup>.

El vidrio, si bien cumple con condiciones de inalterabilidad, puede contribuir a la cesión de Ca, Na, Al ó B, que pueden ser interferencias en el estudio posterior, así como adsorber ciertos metales sino se realiza un acondicionamiento<sup>19</sup>. El uso de tubos plásticos de PVC ó de botellas de este material puede traer inconvenientes debido a la posibilidad de que ciertos elementos como Pb, Sn y Zn que se utilizan en su manufactura como estabilizadores de plastificación puedan ser cedidos en los procedimientos de muestreo y envase<sup>20</sup>. Además se suman inconvenientes como la permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono que pueden modificar la forma química de los compuestos de interés, alterando su especiación y/o partición entre fases. El teflón en los equipos de muestreo y envase, ó bien el polietileno de baja densidad para el almacenamiento, constituyen los materiales más utilizados para la preservación de los metales en matrices acuosas<sup>21,22</sup>.

Los procedimientos manuales de colección de muestras utilizados en este estudio, así como los envases que se utilizaron fueron seleccionados tomando las siguientes precauciones:

- se utilizaron botellas de material de polietileno de baja densidad y tapa roscada.



-el material fue lavado previamente con agua de baja conductividad en el laboratorio y enjuagado con la muestra antes de colectarla

-las muestras filtradas y/o acondicionadas en campo según qué metal y en qué forma se fuera a determinar, se cargaron de modo tal de no dejar cámara de aire a fin de prevenir la modificación de la forma química.

-Se tomaron tantas muestras distintas del mismo sector como fuera necesario en función de los diferentes tipos de acondicionamiento requeridos para el total de "target" y para los concomitantes.

El control de calidad de las actividades de campo fue realizado a través de diferentes blancos de campo (muestras similares a la matriz problema libres de analito). La descripción se realizará en la parte experimental del capítulo de aplicaciones.

### **2.3. El acondicionamiento de muestras para su preservación.**

La estabilidad de las especies de interés en el estudio ambiental depende de cuan bien sean preservadas las muestras. Los procedimientos de preservación de una muestra de agua natural comienzan con la selección del material de envase adecuado y continúan llevando la muestra al pH correcto, la protección de las mismas de la luz (previniendo la fotooxidación ó fotoreducción), eliminando la cámara de aire (headspace), controlando la temperatura, y culminan con la eventual adición de reactivos químicos.

Esta etapa de acondicionamiento debe realizarse como resultado del conocimiento de la química de los distintos compuestos a estudiar en presencia de concomitantes, a fin de no alterar la especiación ni la distribución de los mismos en el medio natural. Además, una vez decididas las condiciones, se deberá tener perfecto conocimiento del tiempo máximo (MHT=maximum holding time) que puede transcurrir entre la preservación y el análisis para que los datos obtenidos

tengan significación. Además, las respuestas que se esperen obtener como resultado del estudio, condicionan la forma de preservar la muestra y las actividades que deberán ser realizadas indefectiblemente en campo. Tomando como ejemplo los metales pesados en aguas naturales, las respuestas ambientales que se obtienen de la cuantificación de metales totales, solubles, solubles especiados, suspendidos ó totalmente recuperables<sup>14</sup> son distintas con cada dato<sup>23,24</sup>, y cada uno de estos valores debe que ser obtenido con condiciones diferentes de preservación de la misma muestra.

En la sección experimental del capítulo de aplicaciones se detallarán las condiciones de preservación de muestra para cada tipo de analito y con cada tipo de partición y/o especiación requerida, así como los blancos de campo después del proceso de acondicionamiento.

#### **2.4. La solubilización de los problemas sólidos para el análisis inorgánico.**

Las metodologías analíticas implementadas en el marco del presente estudio, requieren de la obtención de **soluciones**, lo que incorpora al análisis un problema adicional cuando se trata del análisis de sólidos suspendidos y/o sedimentos, esto es, **obtener la solución**.

En el proceso de obtención de una solución que permita luego realizar el análisis se debería:

- evitar la pérdida del analito por volatilización ó adsorción sobre las paredes del recipiente
- evitar la introducción de grandes cantidades de reactivos que resulten de eliminación dificultosa y/o incorporen sustancias extrañas que afecten el análisis.

-aplicar un factor de dilución lo suficientemente pequeño como para no empeorar el límite de cuantificación en el sólido original. esto es máxima cantidad de sustancia en mínimo volumen final. (No olvidemos que aunque los sedimentos son habituales concentradores de metales. los niveles a cuantificar en la solución final seguirán siendo bajos).

En el caso de sedimentos ó sólidos suspendidos, el material a disolver es esencialmente sílice, y la disolución total se logra en recipientes abiertos utilizando ácidos inorgánicos combinados ó fusión alcalina tal como se puede leer de cualquier libro de texto de Química Analítica básica<sup>25</sup>.

Estas dos posibilidades tienen sus ventajas y limitaciones. Mientras que la disoluciones con ácidos inorgánicos permite menor temperatura de trabajo y facilidad en la remoción de reactivos en exceso, obliga a introducir una dilución grande y, excepto en condiciones especiales, no permite la cuantificación de silicio. Por otro lado, los fundentes sólidos si bien imprimen una dilución menor y permiten la valoración de silicio, requieren altas temperaturas que implican mala recuperación del analito, además de la imposibilidad de remoción de los reactivos en exceso.

Si bien está mas allá de los propósitos del presente estudio hacer un "racconto" de las técnicas de disolución mas populares en el análisis ambiental es interesante notar que a partir de la moda ambientalista, los químicos analíticos debieron desarrollar nuevos y mas ingeniosos sistemas de disolución de muestras, que cumplieran con las condiciones enunciadas mas arriba.

Así, se comienza con la disolución de sedimentos en **recipientes cerrados de teflón** con calentamiento en mufla<sup>26</sup> que permite disminuir la temperatura de ataque, eliminar las pérdidas por volatilización del analito y llevar a un mínimo el

manipuleo de muestra. No obstante estas ventajas, la relación masa/disolvente es tan pequeña (en general 1:1000), que las técnicas analíticas tienen que optimizarse para alcanzar límites de cuantificación significativos para un problema ambiental.

Más adelante, la evaluación de contaminación de aguas a través de organismos vivos capaces de acumular por ejemplo metales pesados, se difundió cada vez más por múltiples motivos. Uno de ellos, no necesariamente el más importante, es que permite realizar un "screening" de contaminación con mayor simplicidad en términos de metodología analítica y de número de muestras necesarias para establecer conclusiones, aprovechando el rol concentrador y promediador del entorno que proporciona el proceso de bioacumulación<sup>27-29</sup>. Pero esta circunstancia obliga a trabajar con métodos de solubilización con completa eliminación de la materia orgánica que permitan simplificar el problema analítico de límite de detección, interferencias, contaminación, etc.

De igual manera se debe proceder para el estudio de acumulación de metales pesados en plantas acuáticas ó que se encuentren en contacto con las aguas. Este tipo de material también ha sido objeto de estudio, así como los procesos que conducen a su solubilización y la total recuperación de los metales pesados.

Como respuesta a los problemas de solubilización de muestras inorgánicas ú orgánicas para el posterior análisis inorgánico cuando las matrices son complejas, aparece la disolución asistida por microondas, como método confiable y de gran utilidad para los procesos de solubilización de problemas sólidos ambientales.

#### **2.4.1. Procesos de solubilización asistidos por microondas.**

Los primeros trabajos usando solubilización de muestras sólidas a través de sistemas de calentamiento por microondas fueron realizados hacia el año 1975 con equipos hogareños que eran modificados ligeramente a fin de hacerlos seguros<sup>30</sup>. Los recipientes de reacción se ubicaban, por ejemplo, dentro de otros de material plástico con el objeto de reducir los peligros de explosión y evitar a la vez la contaminación por los vapores ácidos que se desprendían así como la corrosión del propio equipo de microondas. Estos trabajos no resultaron exitosos al comprobarse que los pequeños volúmenes de muestra que se utilizaban en la cavidad no absorbían toda la potencia de microondas y que se producía además, reflexión de la radiación que dañaba el equipamiento. Debido a esta causa, hasta comienzos de 1984, este proceso de solubilización fue considerado una curiosidad académica.

#### **2.4.2. Teoría y diseño de digestores:**

Los métodos tradicionales de calentamiento utilizados en las digestiones clásicas hacen uso de conducción, convección y radiación. El calor es introducido desde afuera por simple contacto del cuerpo a calentar con planchas, muflas y mecheros<sup>31</sup> y se distribuye a través del cuerpo en contacto creando un gradiente de temperatura que es inversamente proporcional a la conductividad térmica del cuerpo.(Fig.2.1.) El calentamiento por microondas se genera por pérdida dieléctrica con lo cual el calor aparece justo en el corazón del cuerpo que va a ser calentado. El gradiente de temperaturas se revierte respecto de los métodos tradicionales dado que se distribuye desde el interior hacia la superficie desarrollándose un método de calentamiento en volumen en lugar de un calentamiento en superficie, disminuyéndose de esta manera los tiempos necesarios para la completa solubilización de muestras.(Fig.2.2).

Las microondas son radiaciones electromagnéticas de alta frecuencia comprendidas entre 300 y 300.000 MHz que tienen efecto sobre las moléculas polares como  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ , etc.. Para aplicaciones que impliquen calentamiento y secado de materiales existen cuatro frecuencias permitidas de las que se usa normalmente la de 2450 MHz<sup>32</sup>. La potencia típica de salida es de 600-700 watts, lo que provoca que en aproximadamente 5 minutos, se puedan suplementar 43000 calorías a la cavidad de microondas para el calentamiento de las muestras.

Este tipo de ondas está generada por un magnetrón que combina un campo magnético  $\vec{B}$  con un campo eléctrico  $\vec{E}$ . (Fig.2.3). A este nivel de frecuencia el componente eléctrico de la onda ( $\vec{E}$ ) cambia de dirección  $4.9.10^9$  veces por segundo lo que provoca un movimiento desorganizado de las moléculas polares sujetas a la radiación de microondas siendo esta agitación desorganizada, la causante del efecto de calentamiento.

#### **2.4.3. Algunos aspectos teóricos del calentamiento por microondas.**

El calentamiento por microondas está basado en la absorción directa de la radiación por la muestra. Como consecuencia de esto, el fenómeno térmico de convección, conducción y radiación es una parte pequeña del balance de temperatura. La transformación de esta energía electromagnética en energía térmica es inducida por dos mecanismos: conducción iónica y rotación de dipolos.

La conducción iónica genera calor como resultante de la resistencia del medio a la migración de iones en el campo electromagnético. La magnitud de este efecto depende de la carga, tamaño y conductividad de los iones disueltos y de la interacción con las moléculas del solvente<sup>33</sup>.

La rotación de dipolos es la consecuencia de la rotación de moléculas polares que tienden a alinearse con el campo eléctrico.

La energía absorbida por el ambiente depende del factor de dispersión ( $\tan \delta$ ) que se define como sigue:

$$\tan \delta = \epsilon''/\epsilon' \quad (2.3);$$

donde  $\epsilon''$  es la pérdida dieléctrica y  $\epsilon'$  la permitividad del ambiente. En la Tabla 2.1 se muestran valores de  $\tan \delta$  para diferentes materiales medidos a 3000 MHz.

La expresión de la potencia permitida consumida por unidad de volumen es:

$$dP/dV = 2.7 \cdot 10^{-11} \cdot F \cdot (\epsilon_r \cdot \tan \delta) \cdot |E|^2 \quad (2.4)$$

donde  $F$  es la frecuencia,  $\epsilon_r$  es la permitividad relativa y  $|E|$  es el módulo del campo eléctrico.

Como consecuencia de esto, la energía consumida es directamente proporcional a la  $\tan \delta$ . Este factor de dispersión es característico del producto que aumenta con la concentración y la temperatura a una frecuencia constante. Este hecho explica porqué la capacidad de absorción de esta energía por una sustancia que es calentada por flujo de microondas aumenta con la temperatura.

La energía de microondas que penetra en una muestra es absorbida por ésta a una velocidad que depende entonces de su factor de dispersión. Cuanto mayor sea este factor, más fácilmente podrá la muestra ser calentada dado que la energía será absorbida y disipada con mucha rapidez.

#### **2.4.4. Selección del tamaño de muestra**

Como vimos al comienzo, si el factor de dispersión es grande, la muestra es menos penetrada por la radiación de microondas. En las muestras grandes que poseen grandes factores de dispersión, el calentamiento que ocurre mas allá de la

profundidad de penetración de microondas se debe a conducción térmica por colisiones moleculares. De allí que las temperaturas alcanzadas en la superficie de la muestra sean mayores que en el interior. Esto constituye un problema solo en los casos en que la penetración sea muy poca y las muestras muy grandes por lo que en general se utilizan muestras pequeñas (100-800 mg) para este tipo de digestiones.<sup>34-36</sup>. El uso de muestras pequeñas presenta una desventaja para el instrumento y para la aplicación analítica. Si la energía no es completamente absorbida puede dañar la fuente por reflexión por lo que los equipos mas modernos presentan un blindaje especial para subsanar el inconveniente. Por otra parte, si la muestra disuelta es pequeña y el analito un microcomponente (como en nuestro caso), la técnica analítica a utilizar deberá optimizarse en límite de detección.

#### **2.4.5. Características del calentamiento por microondas**

Los primeros trabajos relacionados con la solubilización asistida por microondas describían aplicaciones varias sobre muestras específicas utilizando recipientes abiertos ó cerrados y disolución por ácidos. Todos estos esfuerzos mostraban, de una manera empírica, que los resultados eran comparables a aquellos obtenidos con métodos clásicos en términos de completa recuperación del analito sólo que abreviaban el tiempo de trabajo. Mas tarde, se comenzaron a estudiar los distintos parámetros que influenciaban la disolución por ácidos en estos sistemas con especial atención en las condiciones de presión y temperatura durante la digestión<sup>37</sup>. De esta manera se lograron disminuir aún mas los tiempos de digestión, pasando de las varias horas que implicaba una mineralización tradicional a valores de entre 5 y 15 minutos, dependiendo de la muestra, del tipo de digestión (abierta ó cerrada) y de las características del recipiente<sup>38</sup>. Estos



estudios condicionaron la conducción y el diseño del instrumental moderno y de sus accesorios.

#### **2.4.6. Instrumentación**

##### **2.4.6.1. Componentes básicos**

Los componentes básicos de los equipos de microondas (Fig.2.4) son:

- Generador de microondas ó magnetrón que es el que produce la energía de microondas y la propaga a través de la guía de ondas.
- Cavidad de microndas: Enfoca la radiación según su diseño particular, de modo de concentrar la potencia de microondas sobre la muestra.
- "Agitador de ondas": es un artefacto que distribuye la energía incidente en varias direcciones de modo que el calentamiento de la muestra resulte menos dependiente de su posición.
- Circulador de ondas: evita el reingreso de microondas al magnetrón.

Todos los equipos tienen la posibilidad de seleccionar la potencia de trabajo. El valor de potencia utilizado dependerá de la evolución de presión y temperatura en el recipiente de digestión y del proceso químico de digestión en sí.

##### **2.4.6.2. Materiales**

Existen tres clases de materiales para microondas. los reflejantes (metales) que reflejan la energía pero no calientan y se utilizan para la construcción de los componentes primarios, los transparentes (ó de bajo factor de dispersión) que permiten la penetración sin calentamiento y los arsorbentes (de alto factor de dispersión) como por ejemplo las soluciones ácidas que se utilizan en el proceso de solubilización.

### 2.4.6.3. Recipientes

Se utilizan de materiales de bajo factor de disipación. (Ver Tabla 2.1). Desde el punto de vista de la transparencia el teflón y el poliestireno son los mejores materiales, y le siguen el vidrio y el cuarzo. Deben ser térmicamente estables, lo cual es difícil de conseguir en el caso de los plásticos por lo que se lo suele reemplazar por cuarzo. En general los recipientes de teflón son los más utilizados en las variedades comerciales<sup>39</sup>. Los tiempos breves en los cuales el analito está en contacto con el recipiente hacen que la pérdida por adsorbabilidad en las paredes del recipiente sea despreciable. De todos modos, se ha demostrado que el cuarzo es el material más apropiado cuando los tiempos de digestión se prolongan<sup>40</sup>.

### 2.4.6.4. Tipos de digestores de microondas

*a) Digestores abiertos:* Este tipo de digestores a presión atmosférica presenta la ventaja de permitir el uso de cantidades mayores de muestra en el proceso de solubilización lo cual lo hace apto para el trabajo con ultratrazas de metales, además de permitir adición secuencial de reactivos en tiempo real y opción de evaporar o preconcentrar la muestra<sup>41</sup>. El proceso de volatilización durante la digestión es la mayor causa de error. El diseño del recipiente de digestión y la temperatura de trabajo (que depende de la temperatura de ebullición del ácido o los ácidos) condicionan la completa recuperación de analitos volátiles.

*b) Digestores cerrados:* En estos casos, la máxima temperatura de trabajo no está condicionada por la temperatura de ebullición de la mezcla ácida. Los parámetros limitantes son la temperatura y la presión que el recipiente de trabajo pueda alcanzar en condiciones seguras. Las digestiones en sistemas cerrados tienen varias ventajas como por ejemplo: usar HF y HNO<sub>3</sub> en la descomposición de materiales que no reaccionarían a presión atmosférica, minimizar la contaminación del aire

del laboratorio, reducir la cantidad de ácido necesaria para la descomposición disminuyendo el blanco asociado a la preparación de muestra, recuperar totalmente las trazas volátiles que suelen perderse en recipientes abiertos<sup>42</sup>. Las condiciones de seguridad así como el sobrecalentamiento de los reactivos a temperaturas que no se experimentan normalmente en sistemas abiertos son las principales desventajas para los cerrados.

#### **2.4.6.5. Las ventajas de calentar por microondas.**

- i) Ausencia de inercia (para comenzar y parar)
- ii) Energía limpia, reproducible y fácilmente automatizable.
- iii) Rapidez de calentamiento
- iv) Acción específica sobre enlaces de tipo polar y sobre la entropía del medio a ser calentado.

Las ventajas analíticas que se desarrollan a partir de estas posibilidades son innumerables y serán mostradas en la parte experimental.

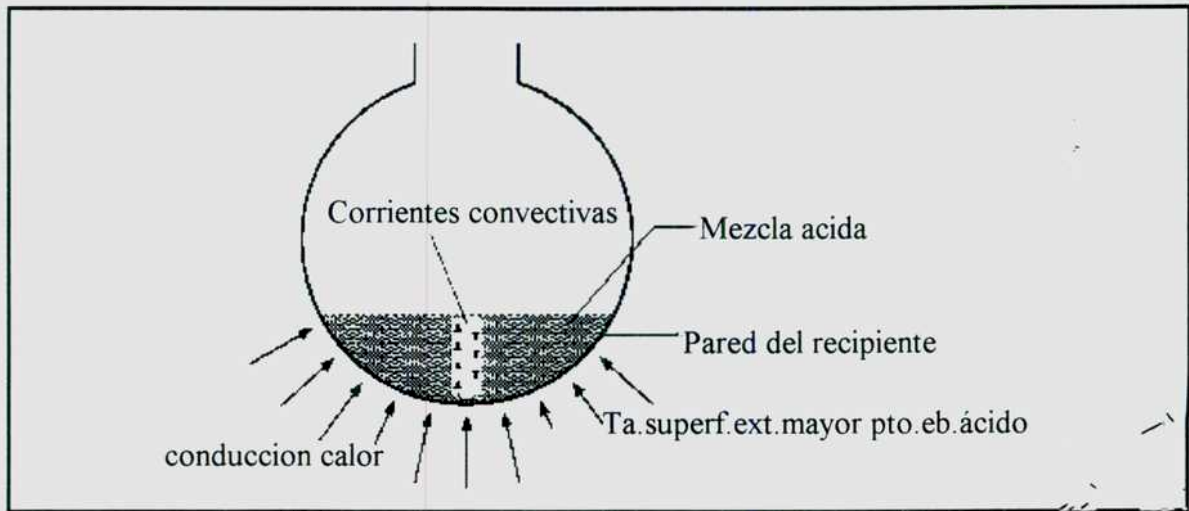
Como conclusión podemos decir que en este trabajo se han desarrollado los programas de calentamiento por microondas que permitieron la solubilización de las muestras sólidas de interés (sedimentos, sólidos suspendidos y plantas) para luego proceder a la valoración de metales pesados con completa recuperación de los analitos en estudio y en el límite de cuantificación de las técnicas analíticas (espectrometrías atómicas ó sistemas en flujo acoplados a espectrofotometrías). Las mezclas ácidas fueron seleccionadas en orden de utilizar mínima volumen de reactivos y disminuir valores de blancos e interferencias por concomitantes. Se han comparado las bondades de las digestiones abiertas y cerradas para cada especie en particular y cada matriz analizada, esencialmente inorgánica en el caso de sedimentos y orgánica en el caso de plantas. El equipamiento utilizado (Prolabo Superdigest y/o Prolabo 301), los programas empleados totalmente desarrollados

en ocasión de este trabajo. la mezcla de ácidos utilizada y los recipientes seleccionados serán presentados en la sección experimental del capítulo de aplicaciones.

**Tabla 2.1.**Factor de dispersión  $\text{tg } \delta$  (mediciones a 3000 MHz)

Material	Temperatura (°C)	$\text{tg } \delta$ (x10)
Agua	25	1570,0
Cuarzo fundido	25	0,6
Cerámicos F.66	25	5.5
Porcelana 4462	25	11.0
Vidrio fosfato	25	46.0
Vidrio borosilicato	25	10,6
Plexiglas	27	57,0
Nylon 66	25	128,0
Cloruro de polivinilo	20	55,0
Polietileno	25	3.1
Poliestireno	25	3,3
Teflon	25	1.5

**Fig.2.1. Sistemas de calentamiento convencional de muestras.**



**Fig.2.2. Sistemas de calentamiento asistido por microondas.**

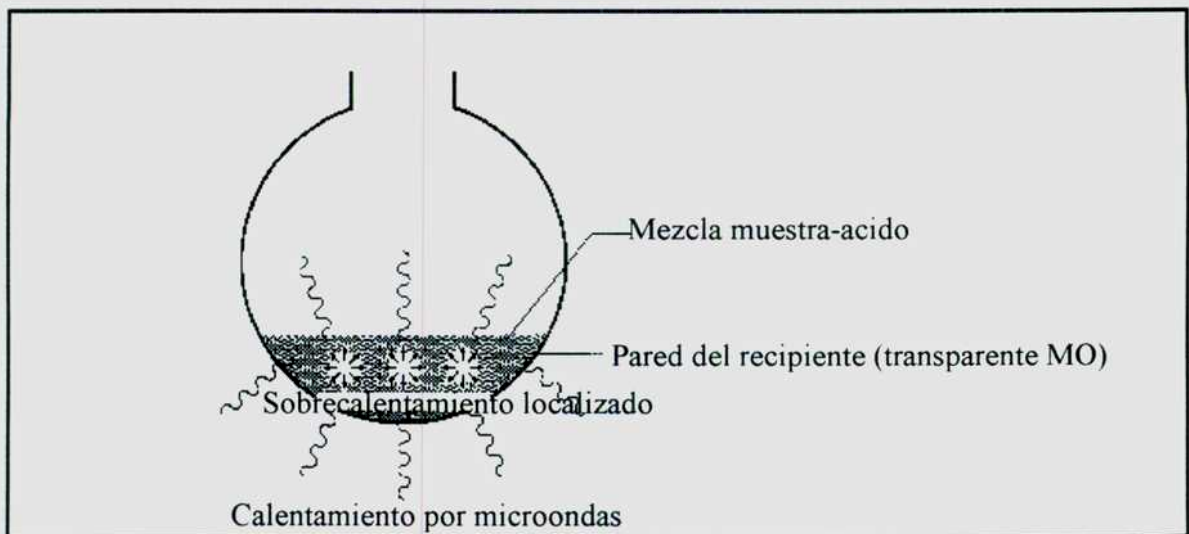


Fig.2.3. Onda generada por el magnetrón

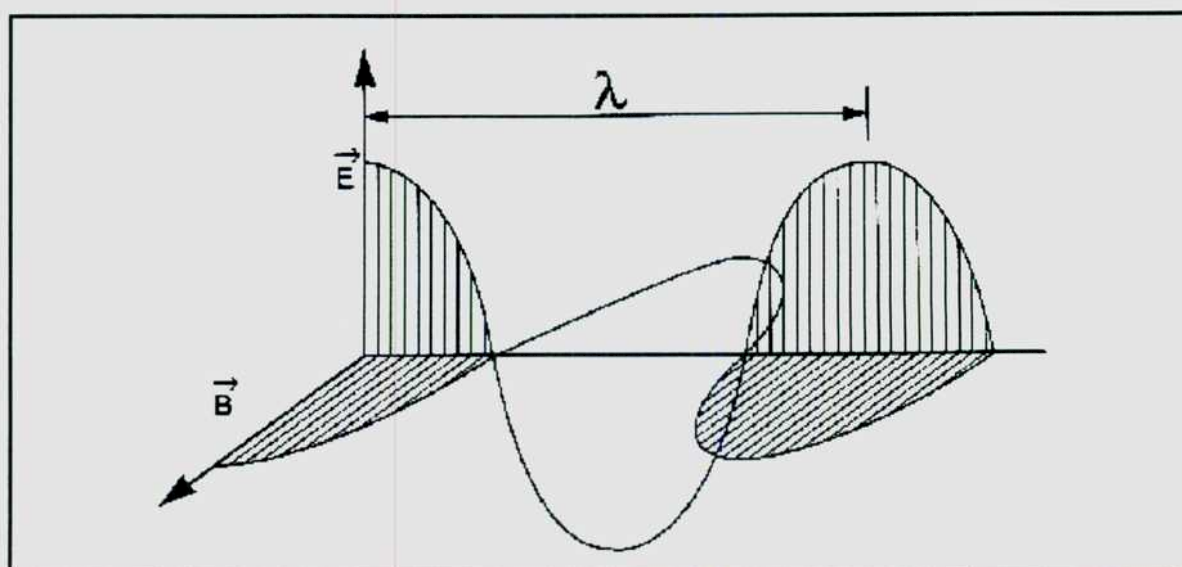
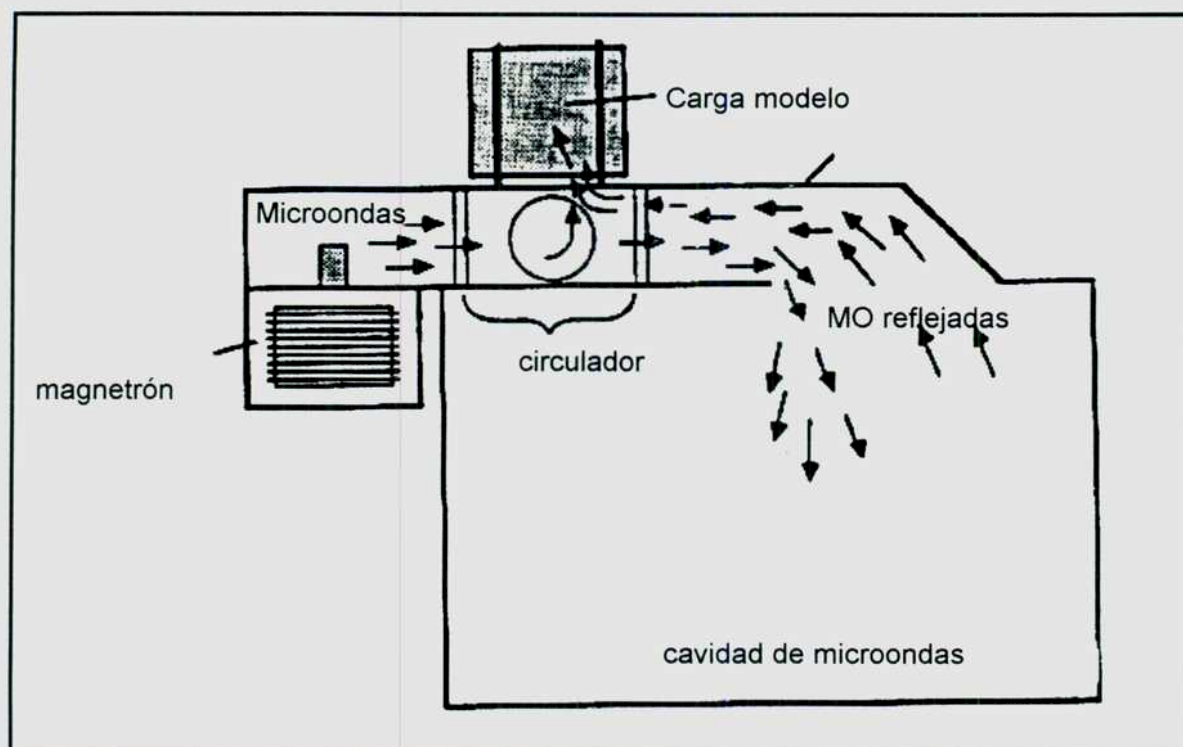


Fig.2.4. Componentes básicos del equipamiento



**CAPITULO 3**



### Capítulo 3

## LA ETAPA DE VALORACION

El diagnóstico de contaminación por metales pesados en aguas naturales implica "medir" en concentraciones muy bajas, tanto mas bajas cuanto más estricta sea la legislación respecto de los niveles máximos tolerables de estos tóxicos.

Estos "niveles tolerables" están condicionados por el uso que pretenda hacerse del recurso. De hecho, el análisis que permite establecer la aptitud de aguas para riego requiere trabajar a un nivel de concentración por lo menos dos órdenes superior que el requerido para declararla apta para proteger la vida acuática<sup>16</sup>.

Recordando lo que decíamos en el capítulo anterior, una vez establecidos con precisión los objetivos del estudio de contaminación, quedan automáticamente condicionadas a ellos las distintas etapas del análisis.

En nuestro caso estudiaremos la contaminación por metales pesados en la zona costera del Río de la Plata con el objeto de establecer su aptitud para la protección de la vida ictícola, lo que obliga a trabajar en concentraciones del orden de ppb.

Esta decisión determina:

a)Respecto del muestreo: Su tipo (que determina el número de muestras) y el uso estricto de blancos de muestreo.

b)Respecto de la preservación de muestras: El tipo de material de las botellas de muestreo, el tratamiento previo de las mismas, los reactivos de preservación y su calidad (definidos en términos de "qué" se quiere medir), el uso estricto de blancos de acondicionamiento.

c)Respecto de la determinación: la técnica a utilizar y la forma de optimizar sus parámetros de mérito en muestras reales con especial énfasis en la mínima

cantidad observable, la necesidad de automatización del trabajo analítico (para acortar tiempos al trabajar con gran número de muestras), el uso estricto de blancos de laboratorio.

d)Respecto de la evaluación: La elaboración de conclusiones valederas serán posibles sólo a través de datos confiables, lo que obliga a controlar la "calidad" de los resultados a través de la calidad de todo el proceso que lleva a obtenerlos.

Las técnicas analíticas originales utilizadas en este trabajo, han sido cuidadosamente seleccionadas y optimizadas en en función de las concentraciones a medir, las características de las muestras y el tipo de información que se quiere obtener del resultado. Los parámetros de mérito se han optimizado en función de su relevancia en cada problema concreto.

### **3.1 Los parámetros de mérito y su rol en la calidad**

La Química Analítica ha estudiado durante mucho tiempo la optimización de parámetros de mérito de las técnicas utilizadas para "medir" sin controlar la calidad del proceso completo que involucra obtener un dato.

La calidad es el valor numérico de un conjunto de propiedades deseadas que posee un producto, proceso ó servicio y que le confieren la aptitud de satisfacer las necesidades y las expectativas del cliente<sup>43</sup>. Si bien es una noción relativa, puede ser apropiada ó no en función de que el producto obtenido se ajuste a los requerimientos del objetivo. En las dos décadas pasadas, por ejemplo, se han desarrollado una serie de técnicas terriblemente poderosas para el análisis de muestras complejas, pero poca atención se ha prestado a la calidad del dato y a la rapidez con la que debe obtenerse. Aún más, existen claros signos de datos no

confiables y de resultados que producidos en diferentes laboratorios no coinciden. en particular en temas relacionados con contaminación, tal como muestra y ejemplifica King<sup>44</sup>.

Los parámetros de mérito utilizados por los químicos analíticos para evaluar la "performance" de una técnica analítica son solo un aspecto del objetivo de calidad del proceso completo, por lo que preferimos hablar de parámetros de calidad que permiten evaluaciones globales e incluyen a los parámetros de mérito. Los parámetros de calidad de un análisis pueden ser de tipo matemático-estadístico ó bien de tipo económico<sup>45</sup>. Es de esperar que los diversos parámetros de calidad de un proceso analítico sean elevados y que en su obtención se haya controlado la calidad.

Los parámetros de calidad del primer tipo son:

a) exactitud, b) precisión, c) representatividad, d) sensibilidad, e) selectividad, f) límites: de detección y de linealidad.

Los parámetros de calidad del segundo tipo son:

a) inversión, b) mantenimiento, c) simplicidad, d) gastos directos e indirectos, e) rapidez, f) facilidad de operación.

Entre los parámetros de calidad unos son de tipo cualitativo mientras que otros son cuantificables. En este proceso de asignar un valor determinado se requiere realizar operaciones como repetir medidas, comparar unos valores con otros, confirmar hipótesis, etc., necesitándose la estadística para la extracción de información química<sup>46</sup>.

Los parámetros de calidad cuantificables se definen (según las fuentes que se señalan entre paréntesis) de la siguiente manera:

*Límite de detección instrumental:* La concentración equivalente a una señal del analito que es igual a tres veces la desviación estándar de siete medidas replicadas de la señal de un blanco de reactivos medida en idénticas condiciones<sup>14</sup>.

*Límite de detección metodológico:* La mínima concentración de sustancia que puede ser medida e informada con un 99% de confianza de que la concentración del analito es mayor que cero. El límite de detección metodológico se obtiene del análisis de una muestra en una matriz dada que contiene al analito y que ha sido procesada conforme el procedimiento de preparación<sup>14</sup>.

*Sensibilidad:* Es la pendiente de la curva analítica "señal vs.concentración". por ejemplo la relación entre intensidad de emisión y concentración en ICP. En absorción atómica en particular se define como la concentración en mg de metal por litro que produce una absorción del 1%<sup>14</sup>.

*Ambito lineal ó limites de linealidad:* El ámbito de concentraciones en el que la curva analítica es lineal<sup>14</sup>.

*Exactitud (ó trazabilidad):* Es el grado de concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el verdadero<sup>47</sup>. El valor experimental al que se refiere la definición que ha sido utilizado en este estudio es la media aritmética,  $\bar{x}$ , de una serie de determinaciones,  $n$ , obtenida como:

$$\bar{x} = x_1 + x_2 + \dots + x_n = \sum_{n=1}^n x_n/n \quad (3.1)$$

El término error describe la diferencia entre el valor verdadero y el medido para un cierto parámetro. Existen dos tipos de errores, aleatorios (random) y sistemáticos. Los errores aleatorios no pueden predecirse y varían de signo y magnitud. Se observan cuando al realizar una serie de análisis repetitivos de una misma muestra se obtienen resultados que oscilan alrededor de un valor central. La presencia de errores aleatorios afecta a la *precisión* de los resultados. Los errores sistemáticos dan lugar a una desviación siempre en el mismo sentido y afectan a la exactitud de los resultados. Pueden ser constantes ó proporcionales, en el primer caso el error es independiente de la concentración del analito y en el segundo caso existe una dependencia. Los errores sistemáticos (bias en inglés) pueden deberse a la presencia de contaminación, a la pérdida mecánica de analito, a errores en la curva de calibrado, a interferencias aditivas ó multiplicativas, etc. Las formas de controlar la *trazabilidad* de un resultado serán descriptas mas abajo<sup>48</sup>.

*Precisión:* Es el parámetro que refleja el grado de concordancia que existe entre un conjunto de valores obtenidos al realizar una serie de medidas repetitivas ó independientes unas de otras bajo condiciones específicas, teniendo en cuenta las condiciones en que se realizan las medidas, lo que conduce a la disquisición entre *reproducibilidad* y *repetibilidad*.

La *repetibilidad* establece que se obtengan resultados de ensayos mutuamente independientes mediante el mismo método aplicado a la muestra a analizar, en el mismo laboratorio, con el mismo equipamiento y por el mismo operador en un intervalo corto de tiempo. Es una medida de la varianza interna y refleja la precisión máxima que se puede obtener con un dado método analítico.

La *reproducibilidad* requiere que se obtengan resultados de ensayos independientes mediante el mismo método aplicado a la muestra a analizar en

diferentes condiciones como diferentes laboratorios, diferentes equipos ó diferentes operadores.

Los medidores de precisión que se han utilizado en nuestro trabajo son la desviación estándar  $s$ , y la desviación estándar relativa (RSD) (expresada en algunos casos como coeficiente de variación (CV).

La desviación estándar estima la dispersión de los resultados alrededor de un promedio y se define como:

$$s = \left\{ \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 / (n-1) \right\}; \quad (3.2)$$

donde  $n-1$  son los grados de libertad, o sea el número de estimaciones independientes que pueden obtenerse a partir de un conjunto de datos específicos. Algunos autores utilizan " $n$ " en la expresión de la desviación estándar. Esto significa que el valor de " $s$ " es cero cuando se realiza una sola observación lo que es imposible, dado que implica obtener información de precisión a través de un solo dato.

La desviación estándar posee las mismas unidades que la propiedad medida, pero sucede que, en algunos casos un mismo valor de " $s$ " para dos conjuntos de resultados puede tener un significado analítico distinto dependiendo del valor absoluto de los mismos por lo cual se utiliza la desviación estándar relativa como parámetro de dispersión independiente de la unidad de medida.

$$RSD = s/x \quad (3.3)$$

$$CV = 100 RSD \quad (3.4)$$

La desviación estándar y RSD se pueden utilizar para comparar entre diferentes conjuntos de resultados ó bien entre el resultado obtenido y el de un material certificado, aplicando diferentes tests estadísticos de comparación. Estos tests

estadísticos han sido utilizados en orden de estudiar la trazabilidad de nuestros resultados en el presente estudio por lo que serán descriptos mas abajo.

*Representatividad:* Los estadísticos diferencian perfectamente entre los parámetros que se refieren a una "población" y los que se refieren a unas cuantas observaciones llevadas a cabo "realmente" en esa población (muestras). Cuando el químico analítico determina concentraciones en problemas reales, estas muestras químicas tienen que dar una idea de la globalidad de la población ó sea "representarla". Los resultados obtenidos al analizar las muestras se utilizan para comprobar asunciones respecto de la población lo que determina el **número de muestras** a analizar, que en el caso de estudios de contaminación con calidad "elevada" es siempre alto<sup>49</sup>.

*Rapidez:* Es otro parámetro de calidad cuantificable que se mide en términos de la etapa limitante del análisis que en general, es la cuantificación. En esta etapa particular, la rapidez se denomina "frecuencia de muestreo" ó frecuencia de análisis y se mide en número de determinaciones en la unidad de tiempo ( $h^{-1}$ ).

El trabajo analítico desarrollado en ocasión de este estudio se ha implementado a través de la optimización de los parámetros de calidad, con especial énfasis en la trazabilidad de los resultados.

### **3.1.1. La trazabilidad de los resultados.**

Un resultado analítico se caracteriza por ser el producto de un proceso global de medida conformado por diversas etapas independientes que fueran esquematizadas en el primer capítulo. El desarrollo del proceso de medida químico tiene una serie de características que lo diferencian de otros procesos de medida

(por ejemplo el de magnitudes físicas) debido a que el resultado final del análisis es la suma de un número grande de errores aleatorios que afectan a la precisión, y de errores sistemáticos que afectan a la exactitud.

En las etapas que esquematizáramos anteriormente, intervienen operaciones como la filtración, evaporación, precipitación, extracción, etc. en las que no es posible garantizar la conservación de la masa del analito, pero si bien esto es cierto, también lo es el hecho que, cuidando la forma en que se realizan, estas operaciones pueden hacerse repetitivas<sup>50</sup>. Un ejemplo de ellos es el uso de digestores de microondas en el proceso de solubilización, que garantiza la recuperación completa del analito ó en el peor de los casos una recuperación constante para los metales objeto de este estudio<sup>51</sup>.

El concepto de "trazabilidad" en lugar de exactitud es uno de los más importantes para el químico analítico y está relacionado con la propiedad de establecer referencias adecuadas de nuestro resultado. O sea, un resultado por sí solo no tiene mucho valor si no podemos acreditar su conexión (trazarlo) con una referencia acreditada. Nótese que este concepto es de aplicación universal, y ha dado lugar a las modernas técnicas de Calidad Total.

Como decíamos más arriba, para aceptar la repetitividad de una operación es necesario mostrar que los resultados obtenidos pueden repetirse, ó sea examinar la precisión de las medidas individuales. En nuestro trabajo hemos adoptado el coeficiente de variación y/o la desviación estándar como medidores de dispersión de modo que, a menor coeficiente de variación obtendremos mayor precisión.



La repetitividad de una medida es una "imagen" parcial de su calidad. Hay que ver si esta imagen se repite en condiciones diferentes. esto es estudiar la reproducibilidad.

Cuando se cumplen las dos condiciones, repetitividad y reproducibilidad, se puede decir que el sistema de medida está bajo control estadístico.

Una vez conseguida la condición de control estadístico para el sistema, hay que completar la calidad de la medida comparándola con lo que se "considere convencionalmente" valor verdadero. En condiciones de control estadístico, la desviación entre valor medido y verdadero permite conocer el sesgo de nuestro resultado y corregirlo, con lo cual el resultado obtiene garantía de precisión y de exactitud, ó lo que es lo mismo el resultado es "trazable".

Obviamente para saber si un resultado es trazable es necesario comparar con un valor convencionalmente verdadero. Tratándose de análisis químicos sería comparar los resultados de diversos métodos aplicados por diferentes laboratorios en condiciones ambientales diversas, ó sea, aplicar en mayor escala el sistema utilizado para definir la incertidumbre típica de un laboratorio particular.

La pregunta que surge es, ¿cómo se consigue prácticamente la trazabilidad?. Es obvio que un único laboratorio, con una única técnica de análisis no puede establecer la trazabilidad de sus resultados por lo cual, lo lógico es comparar resultados **entre** laboratorios (nacional y/o internacionalmente) lo que constituye el **primer nivel** de trazabilidad.

En general, es un trámite difícil y lento el de encontrar un conjunto de laboratorios dispuestos a compararse con nosotros en el momento que mas nos

convenga y con nuestras condiciones de contorno (analito, nivel de cuantificación, matriz particular, etc.). Por esta causa, se usan los "materiales de referencia" ya sea estándares (SRM) ó certificados (CRM) que se consideran en **segundo nivel** de trazabilidad<sup>52,53</sup>. El **tercer nivel** de trazabilidad consiste en usar métodos de referencia ó de práctica común que involucren el uso de otras técnicas diferentes pero de las que se conoce su valor dentro de la escala de calidad<sup>54</sup>.

En nuestro trabajo hemos utilizado tanto los métodos referee como materiales de referencia certificados NIST para asegurar la calidad de los resultados. Los CRM fueron seleccionados según las siguientes condiciones de contorno<sup>55</sup>:

- a) Coincidencia razonable entre la matriz de las muestras a ser analizadas y el tipo de material de referencia
- b) Coincidencia razonable entre la concentración del analito en la muestra y en el material de referencia.
- c) Incertidumbre<sup>1</sup> del valor certificado pequeña con respecto a la incertidumbre requerida para estimar la trazabilidad.

### 3.1.2. Validación de resultados y evaluación de su trazabilidad.

La validación de un método de análisis consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a los requisitos establecidos por el usuario en términos de parámetros de calidad. En el procedimiento de validación, el analista está interesado en la trazabilidad del método empleado. La pregunta: ¿este método es trazable?, se reformula en términos de pruebas de significación, esto es, ¿existe diferencia estadísticamente significativa entre el valor medio y el considerado verdadero?. Planteada una hipótesis  $H_0$  que implique decidir si el método es

<sup>1</sup> Todo resultado analítico se expresa como Valor 1  $\pm$  Valor 2. El valor 1 representa la trazabilidad y el valor 2 la incertidumbre del resultado, ó sea el intervalo en el que podremos encontrar con un margen de seguridad dado el valor 1

aceptable. la decisión a tomar puede ser aceptarla ó no y ademas puede ocurrir que esa hipótesis sea cierta ó falsa por lo que se dan las siguientes posibilidades:.

		Decisión adoptada durante el test	
		Aceptación	Rechazo
Situación real	$H_0$ cierta	correcta	<b>error 1a.especie "<math>\alpha</math>"</b>
	$H_0$ falsa	<b>error 2a.especie "<math>\beta</math>"</b>	correcto

Puede observarse que la decisión es correcta al rechazar una hipótesis falsa o aceptar una correcta. El error que se comete al rechazar una hipótesis cierta es de primera especie ó  $\alpha$ , el aceptar una hipótesis falsa lleva a cometer un error de tipo  $\beta$ . En nuestro interés por la trazabilidad, por ejemplo, cometer un error  $\alpha$  ó falso positivo es suponer que nuestro método no es trazable cuando en realidad lo es. Por el contrario, cometer un error falso negativo ó de tipo  $\beta$ , es considerar nuestro método trazable cuando en realidad no lo es (cometeremos errores sistemáticos en el análisis de las muestras problema). Es obvio que el error de segunda especie es más "grave" para el químico analítico que el de primera. La potencia del test de verificación se mide en términos de  $1-\beta$ , y depende de  $\alpha$ , del número de observaciones realizadas y de la diferencia real entre los valores comparados.

Para llevar a cabo cualquier test estadístico es necesario definir:

- 1. -La hipótesis nula ( $H_0$ ) que establece que no hay diferencias entre valores.
- 2. -La hipótesis alternativa ( $H_1$ ) que establece la presencia de diferencias entre parámetros.

3. -El test estadístico: En esta etapa se realiza el cálculo del parámetro estadístico del test, por ejemplo  $t$  calculado, suponiendo que las medidas realizadas con muchas repeticiones, se distribuyen según una función de densidad de probabilidad normal.

4. -El nivel de significación  $\alpha$  que queremos asignar al test estadístico, teniendo en cuenta también el error tipo  $\beta$ .

5.- La región crítica ó el conjunto de valores, normalmente extremos tales que, cuando  $H_0$  es cierta, la probabilidad que observemos algunos de ellos es baja (la probabilidad es  $\alpha$ ).

Finalmente, se observa si el valor calculado se encuentra dentro de la región crítica y entonces se rechaza la hipótesis. De lo contrario  $H_0$  no puede rechazarse.

Ejemplo: Supongamos que un material de referencia tiene la concentración del analito de interés en  $\bar{x}_r=5.00$  ppm y se llevan a cabo 12 determinaciones repetidas en condiciones de reproducibilidad mediante nuestro procedimiento, obteniéndose un valor  $\bar{x}_R = 4.95$  ppm. El valor de  $t$  calculado=2,37. Como  $t$  tabulado = 2.201 (para un  $\alpha$  de 0,05 y 11 grados de libertad)<sup>47</sup>, es mayor que  $t$  calculado se rechaza  $H_0$  y se concluye que el método no es trazable.

Nótese que la conclusión sobre trazabilidad se ha definido a través del error  $\alpha$ , o sea la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando en realidad es cierta. De haber considerado el valor  $\alpha = 0,01$  hubiéramos reducido la probabilidad de cometer un falso positivo, ó mejor, de concluir que no somos trazables cuando en realidad lo somos. (para  $\alpha=0,01$ ,  $t$  calculado=3.106 con lo cual  $t$  calc <  $t$  tab y somos trazables).

O sea, que cuanto menor es alfa, mayor es la posibilidad de aceptar  $H_0$  y ser trazables. Sin embargo, este beneficio aparente conlleva a la aparición del error de segunda clase. ¿Cuál es la probabilidad que tenemos de aceptar que somos trazables y no serlo?.

Las tablas de distribución  $t$  que consideran  $\alpha$  y  $\beta$ , muestran que la posibilidad de cometer un error de segunda especie con  $n=12$  y  $\alpha=0.05$  es 0.35, y si  $\alpha$  disminuye a 0.01,  $\beta$  aumenta a 0.6 con lo que aparece un 60% de posibilidades de cometer un falso negativo.

Conclusión: la única manera de disminuir tanto alfa como beta es aumentar el número de determinaciones.

(Nótese que en los libros de estadística se encuentran dos tipos de tablas distintas para cada uno de los valores de alfa y beta, denominadas tablas de una cola y de dos colas. La tabla a utilizar dependerá del tipo de información que se quiera obtener de la comparación, esto es, si la media aritmética es diferente en términos estadísticamente significativos del valor considerado verdadero o si es mayor ó menor que este valor).

### **3.1.2.1 Comparación de la medida de un conjunto de resultados con un valor de referencia.**

El material de referencia certificado tiene asignado el valor de concentración del analito de interés al que llamaremos  $x_r$  y consideraremos valor verdadero.

Deberemos entonces analizar repetidamente el material de referencia obteniéndose de este modo una serie de medidas repetitivas. La media aritmética  $\bar{x}_R$  de esta serie de resultados, estando ausentes los errores sistemáticos, debería coincidir con el valor  $\bar{x}_r$  proporcionado por NIST.

En realidad existen también los errores aleatorios, que si bien se compensan cuando crece  $n$ , provocan diferencias entre  $x_r$  y  $x_R$ . Es necesario saber entonces, si la diferencia corresponde a errores sistemáticos ó aleatorios. La resolución implica aplicar el test de student<sup>47</sup>.

$$t \text{ calculado} = \frac{\overline{x}_T - \overline{x}_R}{s_R/\sqrt{n}} \quad (3.5)$$

y está derivada directamente de la expresión del intervalo de confianza para la medida aritmética.  $\overline{x}_R \pm t.s_R/\sqrt{n}$ . (3.6)

El valor absoluto obtenido se compara con el valor de t tabulado para una probabilidad de cometer error de primera clase y de segunda clase y n-1 grados de libertad<sup>56</sup>. Si t calculado es menor que t tabulado, se acepta la hipótesis nula, no existen diferencias significativas entre  $\overline{x}_T$  y  $\overline{x}_R$ , no se han detectado errores sistemáticos y el procedimiento es trazable al nivel de significación elegido.

Se puede ver que cuanto mayor es  $s_R$ , mayor probabilidad tiene el método de ser trazable, pero en este caso hay un sacrificio en la precisión. Esta forma de proceder sería incorrecta porque antes de evaluar la trazabilidad es necesario saber si nuestro laboratorio se encuentra bajo control estadístico y los resultados siguen una distribución de densidad de probabilidad gaussiana, lo que se logra a través del cálculo del parámetro z, que es un parámetro estadístico tabulado que define la posibilidad de distribución tipo Gauss de los resultados y es solo calculable para  $n > 30$ .

$$z \text{ calculado} = \frac{\overline{x}_T - \overline{x}_R}{s_R/\sqrt{n}} \quad (n=30) \quad (3.7)$$

En caso de que los resultados no cumplan con esta premisa se estudia la presencia de resultados discrepantes ó "outliers".

### 3.1.2.2. Comparación de las medias de dos conjuntos de resultados

Cuando nuestro procedimiento de ensayo se valida respecto de un denominado "método referee", se obtienen dos conjuntos de datos con sus valores

promedio respectivos  $\bar{x}_T$  y  $\bar{x}_R$  y sus desviaciones típicas  $s_T$  y  $s_R$ . La verificación de la trazabilidad se lleva a cabo mediante la comparación de ambas medias aritméticas de los dos conjuntos de datos.

Si el número de resultados  $n_T$  ó  $n_R$  de los dos conjuntos de datos considerados independientes es menor que 30, si cada uno de ellos sigue una función de densidad de probabilidad gaussiana y si las varianzas  $s_T^2$  y  $s_R^2$  no difieren en forma estadísticamente significativa, se calcula el valor  $t$  de Student según la ecuación:

$$t \text{ calculado} = \frac{\bar{x}_T - \bar{x}_R}{(s^2(1/n_T + 1/n_R))^{1/2}} \quad (3.8)$$

donde  $s^2$  es la varianza conjunta o varianza "pool" de los dos grupos de resultados:

$$s^2 = \frac{(n_T - 1)s_T^2 + (n_R - 1)s_R^2}{(n_T + n_R - 2)} \quad (3.9)$$

Satisfecha la hipótesis de nulidad en términos de los valores seleccionados de  $\alpha$  y  $\beta$ , se puede concluir que no existen diferencias estadísticas significativas entre las dos medias aritméticas obtenidas con los dos métodos.

Para saber si no variación significativa entre las varianzas de los dos métodos se aplica el test de Fisher "F"<sup>57</sup>:

$$F = s_T^2 / s_R^2 \quad (3.10)$$

( $s_T$  y  $s_R$  se ubican de modo tal de que el cociente sea mayor que 1).

Para los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  elegidos y con los  $n_T - 1$  y  $n_R - 1$  grados de libertad, no existe diferencia significativa entre varianzas cuando  $F_{\text{calculado}}$  es  $< F_{\text{tabulado}}$ . En caso de que exista diferencia, la comparación debe realizarse a través de la

aplicación del test de Cochran que no describiremos pero puede consultarse en el libro de Box et al.<sup>57</sup>.

### **3.1.2.3 Comparación de dos conjuntos de resultados y aplicación de la regresión lineal.**

La comparación de las medias de dos conjuntos de datos mediante el test de student permite verificar la presencia ó no de errores sistemáticos para una única concentración de analito por lo cual no permite establecer si los eventuales errores cometidos dependen de la concentración del analito. En general, para obviar este problema se prepara un conjunto de muestras en el ámbitos de concentraciones que con mayor frecuencia se encontrará en la práctica. y se analizan por los dos métodos que se pretenden comparar. Una de las posibilidades de realizar esta comparación es la de los conjuntos de resultados apareados<sup>47</sup>, que no describirémos ya que no fue utilizado en nuestro trabajo.

Una alternativa a esta técnica de validación la constituye la regresión lineal por la técnica de cuadrados mínimos. Este es el caso más común en nuestras experiencias. donde los resultados obtenidos con nuestros nuevos métodos se comparan con los de referencia<sup>58</sup>.

La ausencia de todo error, sistemático y/o aleatorio, se puede manifestar mediante la obtención de una línea recta (a) de pendiente unidad y ordenada al origen cero. La presencia de un error de tipo sistemático proporcional modificará la pendiente de la recta como aparece en (b), un error sistemático constante modificará la ordenada al origen como se observa en (c). Los errores aleatorios darán lugar a una dispersión de los puntos experimentales alrededor de la línea de



regresión. La presencia de los tres tipos de errores da lugar a la recta (d).<sup>2</sup> Las rectas obtenidas pueden verse en la Figura 3.1.

En ocasión del presente trabajo se han utilizado los que anteceden como test estadísticos de validación de resultados por lo que no reiteraremos en la parte experimental las formas de cálculo para el establecimiento de la condición de "trazable" ó "convalidado".

### **3.1.3. Selección de los parámetros de calidad.**

No cabe duda que para verificar la calidad de un método, se deben definir previamente los parámetros de calidad ó de mérito en los que se está interesado dado que, es imposible lograr valores elevados para todos ellos simultáneamente

Al enumerar los distintos parámetros de calidad, en especial los de tipo estadístico (grupo I), no atribuimos un factor de ponderación para cada uno de ellos. Los parámetros maspreciados del grupo I son la exactitud y la precisión, los que deberían mantenerse siempre elevados cualquiera sea el trabajo que se encare. Sin embargo algunas veces se sacrifican por parámetros económicos como costo, rapidez, necesidad de inversión, etc. Los parámetros secundarios del mismo grupo como límite de detección, ámbito lineal, sensibilidad, frecuencia de muestreo, etc., se ponderan en términos económicos pero también en términos de necesidades reales, lo que lleva a realizar una "ponderación inteligente" de los mismos.

Las metodologías analíticas que se presentan en este trabajo han sido seleccionadas teniendo en cuenta estos factores de ponderación.

---

<sup>2</sup>Debe notarse que cuando la recta de regresión se aplica a la calibración el error se manifiesta en sólo uno de los ejes mientras que en este caso se manifiesta en ambos y condiciona el establecimiento de conclusiones.

Los métodos de diagnóstico de contaminación por metales pesados implican cuantificar ppb, lo que hace del límite de detección un parámetro "no sacrificable" junto con la exactitud y la precisión de las medidas. Mientras tanto, el ámbito de linealidad, tiene un factor de ponderación bajo.

El estudio y cuantificación de concomitantes de ocurrencia natural en las aguas requieren una elevada ponderación del ámbito dinámico de linealidad y de la sensibilidad del método unidas a la precisión y exactitud, mientras que el límite de detección no necesita ser optimizado.

Análogamente se ponderaron los distintos parámetros de calidad en ocasión del análisis de suelos.

Este criterio de mejoramiento del límite de detección nos llevó a realizar el análisis de especiación de vestigios metálicos a través de espectrometrías de absorción atómica con fuentes de producción de átomos no convencionales y/o de espectrometrías UV-visible, utilizando en ambas, cuando fuere necesario, concentración previa del analito y separación de interferentes.

Las técnicas de análisis de concomitantes utilizaron detectores convencionales acoplados a sistemas en flujo (FIA), optimizados en términos de ámbito de linealidad y sensibilidad.

En todos los casos, la alta ponderación conferida a la trazabilidad de los resultados nos llevó a realizar una cantidad muy grande de determinaciones (varios replicados de cada muestra) con lo cual la frecuencia de muestreo se transformó en un factor importantísimo, y la "automatización" de la etapa de valoración a través del uso de automuestreadores y/o sistemas en flujo un objetivo insoslayable.

### 3.2. Aspectos estadísticos del análisis de vestigios

Tal como señaláramos más arriba, el parámetro de calidad por excelencia del análisis de vestigios es el límite de detección. De las mismas definiciones de límite de detección surge cuando se trabaja en un ámbito de concentraciones bajas es necesario lograr el **máximo contraste** entre la señal del analito y la señal de proveniente del fondo.(ruido).

Definimos señal como la salida de un transductor, por ejemplo un fototubo, electrodo, etc., que está respondiendo al sistema químico que nos interesa y que puede tener como origen al analito por un lado, y a los componentes de la matriz de la muestra y de la instrumentación utilizada para medir por el otro<sup>59,60</sup>.

Con estas condiciones, medir a nivel de pequeñas cantidades con exactitud y precisión elevadas significa reducir el ruido y, concordantemente intensificar la señal producida por el analito.

La capacidad de un sistema instrumental para discriminar entre señales se expresa a través de la relación señal/ruido:  $S/R$  donde "S" es la amplitud media de la señal originada por el analito y "R" la amplitud media del ruido originado en ausencia del analito para señales de corriente continua. Es obvio que una disminución del ruido implica una señal mas "contrastada". Pero una vez que la cantidad química ó física se ha convertido en señal electrónica, el proceso de amplificación no aumenta el "contraste" dado que, un aumento en la señal de interés va acompañado con un aumento en el ruido. Cabe señalar que estas consideraciones son de aplicación a sistemas electrónicos analógicos de lectura "on line" ya que cuando se trabaja con señales digitalizadas y que provienen de la acumulación de ciclos repetitivos de medición, el ruido, al ser aleatorio, se cancela y el contraste aumenta notablemente.

El químico analítico debe conocer las fuentes de ruido de su instrumento y de los componentes que se utilizan para minimizarlo.(dispositivos electrónicos como filtros, amplificadores lock-in, etc.). También es indispensable que conozca el sistema químico con el que está trabajando, los componentes de la matriz y su ingerencia en la señal de fondo. Por ejemplo, las técnicas separativas que se utilizan para "aislar" al analito de la matriz de la muestra reducen la señal de fondo y optimizan el contraste toda vez, que el proceso separativo no sea "per se" contaminante. Además, con la misma técnica analítica es posible modificar la metodología y lograr el incremento de la señal específica por aumento simple de la "cantidad" a cuantificar. Se utilizan para esto los procesos de preconcentración que como los de separación no deben introducir contaminación. Todos estos aspectos condicionaron la metodología analítica del trabajo tal como enunciáramos más arriba.

Por otro lado, conforme la concentración del analito se aproxima a cero, la señal desaparece dentro del ruido y aparecen los componentes estadísticos en la expresión del límite de detección, dado que se define como la concentración de analito "x" que da una señal que es **significativamente diferente** de la señal del blanco "xb", lo que deja al analista en cierta libertad de definir "diferencia significativa".

En general se utiliza:

$$x - x_b = 3\sigma_b \quad (3.11);$$

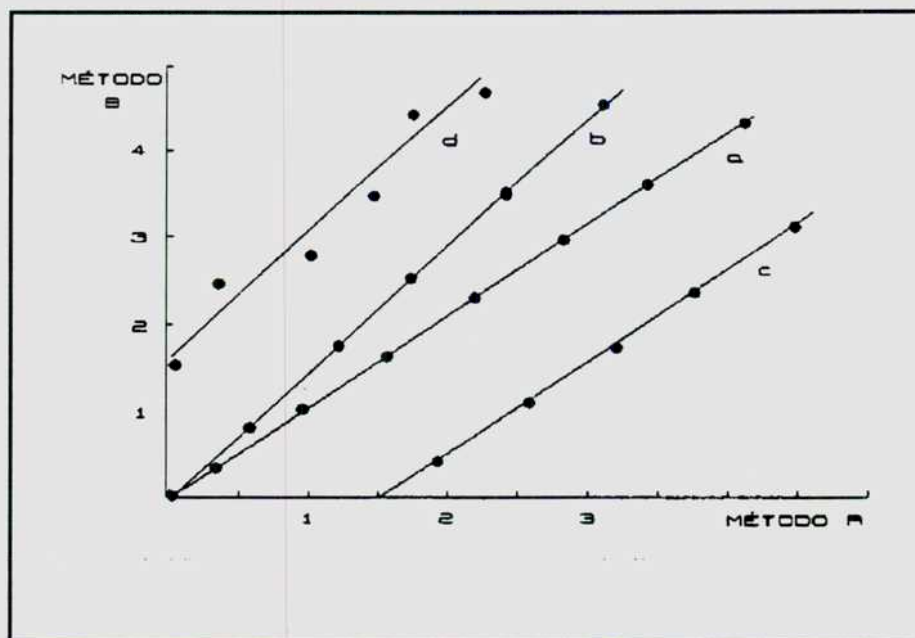
donde  $\sigma_b$  es la desviación estándar de las lecturas del blanco ó de la muestra sin analito que implica asumir que existe un 99% de probabilidad que  $x - x_b$  sean distintos. No obstante esto, toda vez que se indica un límite de detección, el analista se enfrenta a dos problemas: decidir que un analito se encuentra presente

cuando en realidad no lo está y decidir que está ausente cuando en realidad está presente. Esto obliga a formular una hipótesis,  $H$ , "el analito está presente", y aceptarla ó rechazarla, lo que puede conducir a la obtención de falsos positivos ó falsos negativos (error de primera especie  $\alpha$  y de segunda especie  $\beta$ , respectivamente) en caso de que la elección no sea correcta.

Las definiciones de límite de detección han ido evolucionando a través de la definición del valor umbral a utilizar (en general  $3\sigma$ ), por encima de la señal promedio generada por la muestra en la ausencia de analito (límite de detección metodológico) y/o por encima del blanco (límite de detección). Este umbral se ha ido aumentando en orden de disminuir la posibilidad de error  $\alpha$ , introduciendo el parámetro "límite de cuantificación" que se define para distintos valores de umbral dependiendo del autor<sup>15</sup>. Como se ve, el establecimiento de la mínima cantidad detectable es, en última instancia, una decisión de tipo estadístico que surge de plantear la hipótesis de nulidad, por lo que se decidió incluirla en este capítulo.

En este trabajo dado que en general, el análisis de vestigios se ha realizado por espectrometrías atómicas con horno de grafito, se ha decidido tomar el criterio de cuantificación recomendado por la bibliografía relacionada con este tema<sup>61</sup> donde por encima de  $3\sigma_b$  y hasta  $10\sigma_b$  se supone al analito cualitativamente detectable, y cuantificable solamente por encima de este último valor. En términos estadísticos estos límites implican una probabilidad entre 99 y 99.9% de certidumbre.

**Fig.3.1.**  
**Comparación mediante regresión lineal de resultados obtenidos mediante dos**  
**métodos analíticos distintos**



# **CAPITULO 4**

## **Capítulo 4**

### **ATOMIZADORES SIN LLAMA EN ESPECTROMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.**

En el Capítulo anterior hemos visto que los parámetros de calidad que se le imponen al análisis ambiental y en particular al análisis de metales pesados en aguas, son lo suficientemente estrictos como para que la masa mínima de analito que debe ser detectada y cuantificada nos obligue a seleccionar cuidadosamente la técnica analítica a emplear.

En esta línea de pensamiento, debemos entonces referirnos a las distintas alternativas metodológicas que están disponibles habitualmente para el químico analítico y que difieren entre sí por las masas mínimas de analito a detectar, el costo inicial del instrumental, el costo de operación, la precisión, la exactitud, etc.

Las técnicas analíticas mas interesantes para el análisis de metales son el análisis por activación neutrónica, la voltametría de redisolución anódica, las cromatografías de iones y las espectrometrías atómicas, que se seleccionan en función del parámetro de mérito que se quiera poner de resalto.

De todas estas las espectrometrías atómicas, en particular la absorción atómica con horno de grafito y con generación de hidruros (de las que hablaremos extensamente en este capítulo), se utilizan con preferencia porque satisfacen la mayoría de las expectativas de las que hablábamos mas arriba.

Si bien no es el objetivo de este trabajo abundar en detalles sobre aquellas técnicas analíticas no empleadas en este estudio, bien vale la pena compararlas para justificar la elección.



A modo de ejemplo, las técnicas radiométricas ofrecen excelentes límites de detección junto a la posibilidad de análisis multielemental<sup>62</sup> pero requieren de una fuente de neutrones de mediana potencia y flujo estable y, trabajar con radionucleídos que deben tener a su vez características particulares en términos de tipo de energía emitida y tiempos de decaimiento a la mitad. Además, en algunos casos se hace imprescindible la separación radiométrica con todos los inconvenientes que esto ocasiona al análisis de vestigios como señaláramos en el capítulo 2.

Las técnicas de voltametría de redisolución anódica ofrecen simplicidad de operación y equipamiento no demasiado costoso, pero todavía reconocen serias dificultades al momento de trabajar con matrices complejas como el agua de río lo que obliga a recurrir a etapas separativas previas para disminuir la posibilidad de resultados espúreos<sup>63</sup>.

Además, ambas técnicas resultan complicadas para aplicar procedimientos de automatización que son imprescindibles al momento de analizar un gran número de muestras.

La cromatografía de iones<sup>64</sup>, quizás la técnica mas versatil para el análisis de aniones<sup>65</sup>, ofrece la desventaja de la inespecificidad en la detección<sup>66</sup>. En general opera con detectores electroquímicos que ofrecen bajo contraste señal/ruido dado que miden la misma propiedad, "conductividad" en la muestra y en el eluyente que genera la señal de fondo. Esto hace muy difícil cuantificar a nivel de ppb a menos que se utilicen etapas previas de concentración. Además, la obtención de especificidad a través de detección espectrofotométrica requiere, por lo general, derivatización pre ó postcolumna que alarga los tiempos de análisis.

La espectrometría de plasma<sup>67</sup> es una técnica analítica apta para el análisis de metales en muy bajas concentraciones con la que se puede acceder a límites de detección comparables a los de absorción atómica acoplada a atomizadores no convencionales. Si bien los espectrómetros de plasma multielementales ofrecen la ventaja de cuantificación simultánea de los analitos en el problema (recordemos que en absorción atómica el análisis de los diferentes analitos es posible solamente en forma secuencial dado las características de la fuente de excitación), su costo y mantenimiento (la fuente de producción de átomos e iones es un plasma de argón) es bastante mas alto que los espectrómetros de absorción atómica por lo que aún no han suplido a estos últimos en el análisis de vestigios metálicos.

Si bien no detallaremos en este trabajo la teoría de la absorción atómica dado que ésta está bien descripta en la extensa bibliografía relacionada con el tema<sup>68-72</sup>, describiremos en particular los procesos que permiten obtener una población atómica dado que de éstos depende muy especialmente la magnitud de la señal analítica.

Desde que la absorción atómica fuera aceptada como técnica analítica de rutina<sup>73</sup> hasta nuestros días, el método más utilizado para obtener una población de átomos de muestra en las variedades comerciales de equipos de absorción atómica es la **llama** . Pero como se verá más adelante, presenta algunas desventajas para ciertos trabajos analíticos que hacen necesario cambiar la forma de producir el vapor atómico.

La producción de vapor atómico ó **atomización** de un analito es el proceso a través del cual a partir de una muestra (en general líquida ó en solución) se puede obtener una población de átomos en estado gaseoso de modo que éstos

puedan absorber radiación electromagnética. Este proceso involucra una serie de pasos complicados e identifica dos problemas discriminables pero interdependientes: la introducción de muestra y la producción de átomos propiamente dicha.

Este es el aspecto en el que la llama como cubeta atómica se ha ganado los laureles. ya que el proceso de introducción de muestras es sumamente sencillo y reproducible. si bien tiene la desventaja de presentar un elevado consumo de muestra.

El desarrollo de los atomizadores "sin llama" propone la optimización de la introducción de muestra y/o de la atomización del analito de una forma no tradicional basada en la "separación" de ambos procesos. los que serán mejor interpretados a través del conocimiento de las características de los atomizadores de llama.

#### **4.1. Atomizadores de llama**

Se puede decir que una llama es el producto gaseoso de una reacción altamente exotérmica. que tiene una temperatura alta y que emite radiación. Las llamas que nos interesan son aquellas en las que los reactantes (combustible y comburente) están en forma gaseosa y uno de ellos es el oxígeno (lo que excluye a la llama de flúor hidrógeno pero no a la que usa óxido nitroso como oxidante). Estos gases pueden aparecer diluídos por otros inertes. como por ejemplo el nitrógeno. que si bien no participan directamente en las reacción química. influyen las características de la llama obtenida como consecuencia de esa reacción. Además las llamas utilizadas son las de tipo "estacionario" obtenidas de forma estable en un mechero. como contraposición a las propagantes ó aquellas

debidas a una explosión. Las sustancias químicas que se utilizan habitualmente en espectroscopía atómica analítica son las que utilizan aire ú óxido nitroso como comburente y acetileno como combustible.

Las propiedades de la llama dependen tanto de los gases que se mezclan como de la forma en la que se mezclan ó de como ocurre la combustión. Todas las llamas de interés analítico involucran un flujo de gases. o sea que una clasificación preliminar puede ser en función de la condición del flujo lo que permite dividir las en **laminares o premezcladas y turbulentas o de difusión**. Las llamas de interés analítico son las **laminares**, en las cuales, en contraposición a las turbulentas, todos los elementos de volumen de la llama se mueven en forma paralela unos de otros. Las llamas más empleadas en espectrometría atómica son relativamente pequeñas y la región de interés es en general cercana a la boca del quemador. La llama laminar se obtiene con un diseño de quemador adecuado que permite un flujo laminar de los gases no quemados que lo abandonan.

Otra división se hace en base a que los gases sean premezclados antes de dejar el mechero (**llamas premezcladas**), o bien que sean mezclados sólo en el momento de alcanzar el punto de ignición (**llamas no premezclada**). Las llamas laminares son **necesariamente premezcladas**, pues no existiría flujo laminar si además de la combustión existiese una mezcla de gases.

#### **4.1.1. Características y estructura de las llamas premezcladas**

La propagación de una llama premezclada estable para una combinación combustible/comburente dada depende de tres factores:

- a) los límites de inflamabilidad: porcentajes mínimos y máximos de combustible capaces de "sostener" la llama y que pueden ser variados en razón de optimizar la sensibilidad:
- b) la temperatura de ignición: mínima temperatura a la que se propaga la combustión espontáneamente para una dada estequiometría combustible/comburente y:
- c) velocidad de quemado de gases: velocidad a la cual ocurre la propagación de la reacción por conductividad térmica entre las capas adyacentes de la mezcla.

Este último es, desde el punto de vista analítico, el factor mas importante porque tiene efecto directo en al ámbito de mezclas gaseosas premezcladas que pueden quemarse de manera segura y estable en un quemador particular.

O sea que, una vez iniciada la combustión, la propagación de la reacción se produce por conductividad térmica entre las capas adyacentes de la mezcla, lo que determina la existencia en la llama de zonas ó perfiles definidos que formarán la estructura de la misma como se puede ver en la Figura 4.1..

Los mezcla gaseosa fría que proviene de la cámara de premezclado entra a una **zona de precalentamiento** y eleva su temperatura hasta la de ignición mediante el calor de la propia llama. Alrededor de esta zona se encuentra la zona luminosa brillante ó **zona de reacción primaria** cuya superficie externa forma el frente de la llama. Esta zona brillante es caliente y provoca una expansión térmica de los gases junto con una caída de presión, evitando la difusión de gases desde la atmósfera. Además es delgada (décimas de milímetro), por lo cual a las velocidades normales de los gases, el tiempo de residencia es muy corto y las reacciones combustible/comburente raramente se completan. Si a esto le sumamos que existe una radiación de fondo muy alta debido a la naturaleza de los procesos

químicos que se están llevando a cabo, es obvio que no es una zona para ser utilizada en espectroscopía analítica si hay alternativas mejores.

Los gases parcialmente quemados que provienen de la zona de reacción primaria pasan a una zona mucho mas ancha, cuya naturaleza depende fuertemente de la relación combustible/comburente, denominada **zona interconal**. En las llamas típicas utilizadas en espectrometrías atómicas, la combustión de los gases da lugar a moléculas como  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$  y radicales como  $\text{H}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{C}_2$ ,  $\text{CH}$  y  $\text{CN}$ . Como esta zona se encuentra en equilibrio térmico, es posible definir en ella perfiles de temperatura y de composición que permiten explicar y predecir los equilibrios de disociación, ionización y excitación que sufre la muestra una vez que ha sido introducida en la llama. Esta es la zona preferida en la espectroscopía analítica.

Los gases calientes que provienen de la zona interconal toman contacto con el oxígeno del aire (que accede por mecanismos convectivos y difusionales) para formar la **zona de reacción secundaria** (manto azul de las llamas aire/hidrocarburo) en la que se completan las reacciones de combustión que se iniciaron anteriormente.

#### 4.1.2. La radiación proveniente de la llama.

Para estudiar la radiación proveniente de la llama se requieren dos aproximaciones: a) conocer que especies la originan y el tipo e intensidad de la radiación de cada una de ellas y b) interpretar los mecanismos responsables de la excitación de las distintas especies en las distintas zonas de la llama.

Estos temas son muy extensos y escapan a los objetivos del presente trabajo. lo que no obsta consultarlos en la bibliografía<sup>74</sup>. Sin embargo, hay ciertos puntos que no deben dejar de mencionarse como por ejemplo:

a) La radiación mas intensa de la llama proviene de la zona de reacción primaria y es atribuible a espectros de bandas moleculares debidas a especies como  $C_2$ , CH, CHO, OH, CN, NO, etc.(dependiendo de la mezcla de gases que conforman la llama). Existe además una radiación de fondo continua debida a incandescencia de partículas de carbón ó procesos no cuantizados.

b) La radiación que proviene de la zona interconal es menos intensa dado que disminuye la población de las especies moleculares que mencionáramos antes. Probablemente la emisión más intensa se deba a OH, aunque puede ocurrir que en llamas ricas en combustibles ó reductoras existan altas concentraciones de especies que contienen carbono. Por ejemplo, la zona interconal de la llama óxido nitroso/acetileno presenta una emisión rojo brillante (pluma roja) debida a la presencia de radicales CN<sup>75</sup>.

c) La zona de reacción secundaria exhibe una radiación mucho menos intensa que la zona primaria, siendo quizás la mas importante la correspondiente a OH. El color azul característico del cono exterior de las llamas de hidrocarburos se debe al continuo que proviene de la reacción:

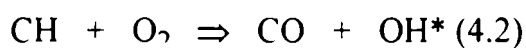


La radiación proveniente de una llama puede, en primera instancia ser separada en dos categorías: **térmica** ó **no térmica**. La última es atribuída a quemiluminiscencia sin otro tipo de explicación, si bien hay que tener en cuenta que toda la energía y radiación de las llamas, es esencialmente de origen químico.

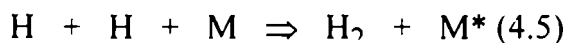
Con la excitación térmica, las especies pasan al estado excitado en función de la alta temperatura del entorno (que implica una elevada energía cinética) antes

de emitir radiación. En otras palabras, la energía se transfiere entre las especies de la llama y se convierte en excitación electrónica por procesos colisionales. Esta energía es la responsable del calor de la llama y se libera durante las reacciones entre combustible y comburente. Esta contenida en las especies de la llama en virtud de sus movimientos y no debe ser confundida con la que está presente en especies de la llama que se forman en el estado excitado.

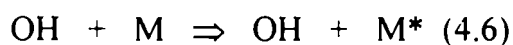
En llamas, la forma mas común de radiación no térmica es la quemiluminiscencia que proviene de la emisión de especies que se han formado en el estado excitado como consecuencia de una reacción química. Por ejemplo la quemiluminiscencia de los propios gases de la llama puede resultar de reacciones como:



Un proceso similar se puede obtener cuando se agregan metales a la llama:



Tambien es posible que, en lugar de que las especies excitadas de la llama pierdan exceso de energía por radiación quemiluminiscente, puedan transferirla a otras especies de la llama ó a los átomos metálicos por colisión:



Resumiendo, en la llama existen tres tipos de equilibrio: **térmico, químico y radiacional**. La falla mas grande que impide alcanzar el equilibrio químico es la combustión incompleta. Sin embargo, las reacciones químicas mas importantes en una llama se completan en tiempos cortos y el desequilibrio químico se restringe solamente a la zona de reacción. De este modo, en las llamas laminar premescladas es posible calcular la composición de los gases de la llama



presumiendo equilibrio completo en zonas determinadas. En condición de equilibrio térmico, la radiación emitida por todas las especies de la llama es función de su temperatura (inversamente, si la radiación de la llama se usa para medir su temperatura, siempre se obtendrá el mismo valor). Aún si asumimos equilibrio químico, el equilibrio térmico no corresponde a un estado de equilibrio completo sino que se necesita además equilibrio radiacional que se adquiere solamente si toda la radiación emitida por la llama se reemplaza por absorción de luz. La llama está lejos de ser un cuerpo negro pero, en llamas premezcladas a presión atmosférica<sup>74</sup>, las especies se desactivan mas por colisiones que por emisión de luz con lo que la emisión de luz tiene un efecto muy pequeño en el equilibrio térmico.

O sea que, la presunción de equilibrio completo en ciertas zonas de la llama hace posible cambiar la performance analítica de la técnica a través de la modificación de la zona de observación, la proporción combustible/comburente y la naturaleza de los mismos, lo que proporcionará un exacto conocimiento de la temperatura y de las condiciones del entorno. Esta optimización de la performance es posible a través del conocimiento del rol que juega el analito en cada tipo de equilibrio involucrado.

#### 4.1.3. La introducción de muestra

La aplicación analítica de la absorción atómica que utiliza una llama como recipiente de muestra se basa en una transferencia eficiente y reproducible de la muestra a la llama, de manera de asegurar la cuantitividad de los resultados obtenidos. La **introducción** de muestras líquidas en llamas como fina niebla se conoce con el nombre de **nebulización**. La forma mas común de nebulizador es el **nebulizador neumático**.

En este tipo de nebulizadores la muestra es introducida, por el comburente de la mezcla oxidante que forma la llama a una cámara de expansión o premezcla en el caso de la **nebulización indirecta**, ó directamente en la llama como en el caso de la **nebulización directa**.

La nebulización indirecta consiste en la mezcla del aerosol producido con el combustible (y muy frecuentemente con oxidante ó gas inerte adicional), tras lo que se produce el pasaje, via una cámara de mezcla/expansión, a la base del mechero. En el caso de la nebulización directa, la mezcla aerosol/oxidante se pone en contacto con el combustible tan pronto como se forma el aerosol con lo cual se tiene una llama turbulenta a través de una unidad de nebulización-quemador combinada. Nótese que existe una unidad de criterio entre llama laminar/premezclada - nebulización indirecta, y llama de difusión /turbulenta - nebulización directa.

El proceso de nebulización en un nebulizador indirecto aprovecha la gran velocidad con la que los gases entran en la cámara de premezcla, para absorber la muestra líquida y convertirla neumáticamente en un aerosol fino por efecto Venturi. A través de un dispositivo separador, las gotas mas grandes se descartan por drenaje mientras que la niebla mas fina es empujada a la camara de premezcla donde pasa a formar parte de la mezcla gaseosa combustible comburente. Un esquema de este tipo de nebulizador se puede ver en la Figura 4.2.

Una vez llegada la niebla a la zona de reacción primaria, se seca el solvente por efecto de la temperatura para formar un "spray seco" pero, recordando lo que dijimos anteriormente, el tiempo de residencia en esta zona es muy bajo y

solamente las gotas muy pequeñas logran "secarse" y seguir adelante con el proceso de atomización.

Este tipo de introducción de muestra, si bien se puede realizar a alta velocidad y con gran reproducibilidad, es ineficiente en términos de la cantidad de muestra que llega a la llama, aproximadamente el 5% del total aspirado. Este pequeño porcentaje, no todo transformable en átomos, sufre además grandes diluciones ya sea en la cámara de premezcla como en el volumen total de la llama.

Se han intentado modificaciones para este sistema como la adición de tensioactivos a la solución ó solventes orgánicos para disminuir la tensión superficial, pero los resultados obtenidos no presentaron grandes mejoras<sup>76</sup>.

Otros intentos fueron la nebulización bajo presión utilizando bombas de presión como las del cromatógrafo líquido, ó nebulizadores ultrasónicos<sup>77,78</sup>, o la introducción directa de muestra en la llama sin nebulización previa como en el caso del uso de la nave de tantalio en la llama de aire/acetileno<sup>79</sup>, pero ninguna de estas posibilidades lograba optimización sustancial de la performance.

#### **4.1.4. La llama como entorno**

Suponiendo que la muestra sea introducida en la llama de una manera totalmente ideal es de esperar que esta última cumpla con ciertas características a saber:

a) Entorno térmicamente adecuado para formar un gas atómico del metal de interés, esto es: su temperatura sea la adecuada para fundir y evaporar los átomos del analito.

b) Inercia química en relación con el vapor atómico, esto es, una vez obtenida una población de átomos en el estado fundamental no debe existir reacción química alguna entre éstos y los componentes de la llama.<sup>1</sup>

c) Transparencia óptica en ausencia del analito, o sea que no exista "señal" de los componentes de llama superpuesta sobre la del analito.

Estos pasos no pueden ser modificados independientemente uno del otro y el entorno que proporciona la llama para un analito dado condiciona la obtención de una señal satisfactoria para éste.

El hecho de que las llamas de interés práctico tengan presente siempre el oxígeno como comburente, hace posible la producción no deseada de óxidos del tipo  $MO_x$  simplemente por ley de acción de masas:



$$K_{eq} = [MO_x]/[M].[O]^x \quad (4.8)$$

Justamente, la tendencia que tienen algunos metales (Al, Ca, Ba, Cr, Ti, As, Se, V, Hg, etc.) a formar óxidos de tipo "refractario" condiciona el número de átomos capaces de absorber radiación de la fuente y empobrece la sensibilidad.

Estos problemas se pueden estudiar a través de un parámetro denominado "fracción de átomos libres"<sup>80,81</sup> que es el cociente entre la población de átomos capaces de absorber respecto de la cantidad total de átomos en la llama. Como puede verse en la Tabla 4.1, mientras que para algunos metales la fracción es cercana a uno, en otros es prácticamente cero lo que se traduce en una sensibilidad muy baja para los mismos.

---

<sup>1</sup>En el proceso de atomización existen una serie de pasos que concluyen en la obtención del vapor metálico. Si se asume que todos ellos están en equilibrio químico, lo que se quiere decir es que el entorno de llama debe ser tal que el equilibrio se desplace para obtener ese vapor metálico.

Una solución que surge inmediatamente es la de aumentar la temperatura de la llama a los efectos de disociar el óxido formado, cosa que da muy buen resultado cuando se trata de óxidos poco refractarios. la otra alternativa es la de disminuir el oxígeno del entorno utilizando llamas ricas en combustible ó reductoras. Nótese que no se trata de un problema de temperatura (la llama reductora es mas fría que la estequiométrica) sino de desplazamiento del equilibrio químico de la reacción de producción de óxidos. La llama de óxido nitroso/acetileno posee esta característica además de una temperatura mayor por lo cual, el número de elementos determinables por absorción atómica se duplicó con la inclusión de esta mezcla, elevando la fracción de átomos libres en varios órdenes como se puede observar en la Tabla 4.2.

La difusión de las llamas de óxido nitroso/acetileno incrementó el problema de la necesidad de llamas "transparentes" al momento de mejorar la sensibilidad. Si miramos a la llama como la celda donde residen los átomos al igual que en absorciometría molecular lo es la cubeta de cuarzo, necesitamos que esta celda no absorba radiación de la fuente. La llama de aire/acetileno es transparente en la zona del visible y se va haciendo más opaca conforme nos acercamos al ultravioleta como se ve en la Figura 4.3. Aparecen las bandas moleculares típicas de ciertos componentes de la llama y en la zona de 200 nm, la fuerte absorción de OH. Por debajo de 190 nm interfieren los componentes del aire (oxígeno) lo que impide trabajar en esta zona. El oxígeno vuelve a interferir en el proceso de obtención de señal por motivos distintos a los que enunciáramos antes.

Un trabajo interesante de Kirkbright y Ranson<sup>82</sup> en la década del 70 introduce las llamas "escudadas", esto es recubiertas de un gas para hacerlas transparentes. El escudado de llama con argón permite por ejemplo, minimizar la

difusión del oxígeno desde la atmósfera y aumentar la transparencia, aunque esta propiedad tiene mayor relevancia sólo cuando se trabaja con analitos cuya longitud de onda de máxima absorción coincide con los sistemas de bandas de absorción moleculares.

Modificaciones como las de este tipo no evitaron los inconvenientes típicos de las llamas a saber:

a) Control limitado sobre el ambiente químico en que se encuentra el analito. Puede ganarse cierto control modificando como dijimos la relación combustible a comburente pero pueden producirse variaciones en las condiciones de atomización (temperatura de llama, modificaciones en su propio espectro, etc.), así como modificando la región de llama que se observa, es decir cambiando indirectamente el entorno químico.

b) Efecto de matriz, o sea el efecto que producen los demás componentes de la muestra aún cuando no tengan influencia sobre la absorción de radiación, que modifica notablemente el grado de disociación de los compuestos en análisis.

d) Disociación incompleta de alguno de los compuestos en los que participa el analito. (Por ejemplo aquellos que forman óxidos refractarios).

e) Necesidad de disponer de una muestra líquida.

f) Falta de transparencia de la llama en la zona de 200 nm. (Impide la determinación de elementos tales como As y Se).

g) Imposibilidad de controlar el mecanismo de atomización del analito, permitiendo separar pasos como desolvatación, disociación, etc.

Si bien la mayoría de los inconvenientes enunciados anteriormente no fue reconocida como tal hasta bien avazados los años 60, desde los comienzos de la espectrometría de absorción atómica se experimentó con sistemas de atomización alternativos.

Así fue como surgieron distintos tipos de "atomizadores" que no dependían totalmente de la llama, sino que usaban sistemas de calefacción eléctricos (de ahí su denominación actual de "atomización electrotérmica"), aplicados a distintos medios conductores como el grafito ó el tantalio. También, un poco más tarde, se comenzaron a emplear sistemas de producción de vapor atómico que no dependían de la temperatura.

Los primeros trabajos desarrollados con el sistema de calefacción de grafito u "horno"<sup>83-87</sup> datan de 1959 mientras que los sistemas generadores de vapor se difundieron un poco después<sup>88-90</sup>.

Dado que estos sistemas de producción de átomos han sido utilizados en las valoraciones objeto del estudio, los trataremos con detalle.

#### **4.2. Atomizadores electrotérmicos: El horno de grafito.**

Desde la primer experiencia de Walsh en el año 1952 (no publicada y descripta luego por el mismo en *Spectrochimica Acta*<sup>91</sup>, a los primeros ensayos de L'vov con un horno de grafito como celda de absorción pasaron solamente siete años durante los cuales la absorción atómica se afianzó como técnica analítica dada la simplicidad, selectividad y especificidad concedidas por el principio físico que la sustenta<sup>73</sup>.

La visión generalizada en esa época era la de la utilización de un sistema estacionario para producir una medida de la absorción atómica tal como se realizaba la absorciometría en solución, para la cual la llama era la cubeta atómica ideal por su reproducibilidad.

Por otra parte, la medición del fenómeno transiente producido por la completa vaporización de una pequeña cantidad de muestra en un tiempo brevísimo, atraía la atención del investigador ruso L'vov, que tenía la mente puesta

en el "análisis absoluto" del que hablaremos luego. Este proceso implicaba calentar el horno "eléctricamente" en una atmósfera de gas inerte, eliminando de esta manera la necesidad de una reacción química para obtener un medio de alta temperatura, al mismo tiempo que "confinaba" al analito en un volumen pequeño, con lo que -al menos en teoría- se debería aumentar la sensibilidad del método.

#### **4.2.1. Diferentes tipos de horno de grafito**

a) El horno de grafito de L'vov.

La base de las experiencias de L'vov<sup>92</sup> consistió en asegurar que la medición de la absorción atómica de una nube producida instantáneamente partiendo de una cantidad discreta de muestra se realizara en condiciones de isothermicidad.

Para lograr su propósito, L'vov propuso un crisol de grafito que poseía un orificio de forma cónica en el que se insertaba un electrodo del mismo material, en donde se cargaba la muestra sólida ó líquida tal como se puede ver en la Figura 4.4. El crisol se encontraba a la temperatura adecuada antes de entrar en contacto con el electrodo mientras que este último, se calentaba solo al entrar en contacto con el primero, cerrándose el circuito de un arco de corriente continua. Para evitar pérdidas por difusión del analito vaporizado, el interior del crisol se recubría con un film de tantalio. Una medida adicional en tal sentido era proteger el sistema del ambiente poniéndolo dentro de una cámara cerrada bajo argón a presión.

Posteriormente<sup>93</sup> reemplazó el recubrimiento de tantalio por uno de grafito pirolizado lo que prolongó la vida útil y disminuyó las pérdidas por evaporación, además de producir un calentamiento uniforme del crisol. También reemplazó el calentamiento mediante el arco por la circulación de corriente continua a través del



electrodo y el crisol. Esto último permitía un calentamiento más uniforme dado que con el arco calentaba más eficientemente la porción en contacto directo con él.

La cámara poseía dos ventanas de cuarzo para la circulación del haz de luz, un pirómetro óptico para medir temperatura y en el interior, una plataforma circular con 4 ó 5 electodos que se posicionaban a través de un tornillo desde el exterior. Esto permitía mejorar la frecuencia analítica al poder analizarse varias muestras sin abrir la cámara cada vez, lo que implicaba purgar y volver a presurizar.

El sistema óptico utilizaba un montaje de dos canales lo que permitía analizar dos elementos diferentes a la vez ó trabajar con un estándar interno (condición imprescindible dado el error de pesada para muestras sólidas y el de reproducibilidad de la inyección para el caso de muestras líquidas).

La difusión de las experiencias de L'vov condujo a diversas opiniones adversas respecto de su utilidad. Woodriff y colaboradores<sup>86</sup> consideraban que el uso de un horno a temperatura constante conducía inevitablemente a una complejidad instrumental y operativa tan grande que sus méritos no justificaban. Estas críticas hicieron que la técnica obtuviera un escaso crédito lo que impidió su difusión en gran escala en tiempos breves.

#### b) El horno de Massmann.

En el año 1968 Massmann<sup>85</sup> describe un modelo de horno que constituye la base del desenvolvimiento en este campo y que se muestra en la Figura 4.5. Si bien este horno no cumplimentaba las condiciones de isothermicidad temporal y espacial que L'vov requería para estos atomizadores, permitía una instrumentación fácil y una simplicidad de uso que lo hizo difundido por práctico.

En el horno de Massmann se utiliza un cilindro de grafito de 10 a 30 mm de largo y 4 a 8 mm de diámetro interno (en su versión actual es de grafito pirolítico para disminuir la difusión de la muestra a través de la pared) que se calienta en sus extremos por efecto Joule, y con refrigeración por agua de los cabezales de los electrodos, en ambiente de gas inerte para prevenir la oxidación. Dado que la resistencia del grafito es baja se puede generar una alta intensidad de corriente a bajo voltaje (10-12 volts). La muestra a analizar (microlitros) se ubica en la zona central del tubo de grafito y el proceso de atomización se logra a través del calentamiento del tubo en etapas separadas que corresponden a la evaporación del solvente, la calcinación del residuo y la atomización propiamente dicha.

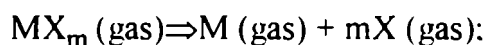
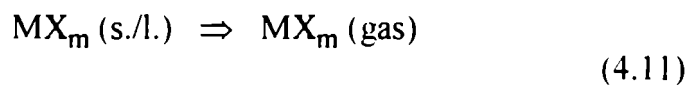
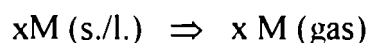
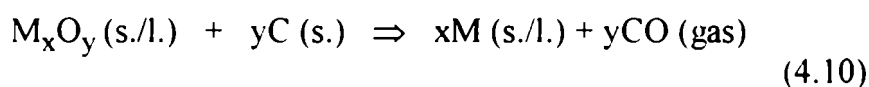
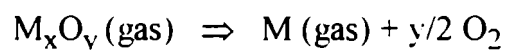
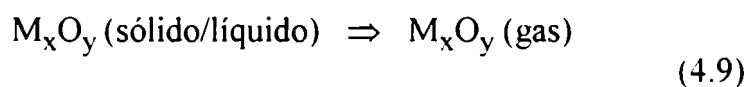
Para que este sistema fuera eficaz desde el punto de vista analítico, debía producir una elevada población de átomos en el estado gaseoso con extrema rapidez. Desde el punto de vista instrumental se requería un sistema de calentamiento que permitía cambios rápidos de temperatura con una electrónica de lectura lo suficientemente veloz como para medir señales transientes del orden de la décima de segundo.

En los instrumentos de primera generación era difícil obtener calentamiento rápido en forma reproducible, es decir, controlada. En la actualidad, se utilizan alimentadores controlados por un microprocesador que permiten no sólo asegurar las condiciones de reproducibilidad adecuadas sino que también han introducido la posibilidad de la programación del ciclo de calentamiento. El uso de pirómetros ópticos permite medir la temperatura de la pared externa del horno y conocer el valor de temperatura adquirida para cada potencia aplicada.

#### 4.2.2. Mecanismos de atomización

Los mecanismos propuestos para la atomización de una muestra en un horno de grafito son en general complejos y dependientes de las condiciones en que se lleve a cabo el proceso como se verá a partir de la descripción del proceso de atomización.

En principio se podría decir que la atomización de un elemento, M, que se introduce en el horno en forma de óxido ú otro compuesto (por ejemplo con la especie X), reaccionara de un modo que de manera muy simplificada puede escribirse como:



Los aspectos cinéticos y termodinámicos de este proceso han sido objeto de estudio de numerosos investigadores que, no obstante esto, no han ofrecido un cuadro muy preciso de la situación. Sin embargo hemos resuelto incorporar un apéndice al presente capítulo para mostrar los últimos desarrollos en este tema en particular.

De todos modos, si observamos las características del entorno químico en el que se encuentra el analito cuando se utiliza una llama ó bien un horno de grafito.

es notorio que este último constituye un sistema muchísimo mas simple que la llama.

En el horno, el analito está presente en cantidades muy limitadas y una vez que se convierte en vapor atómico, "aparece" en un ambiente de gas inerte no reactivo durante un tiempo de residencia del orden del segundo. Durante este tiempo, la temperatura del gas en el interior del horno puede ser mucho más baja que la de una llama, lo que puede dar origen a reacciones químicas que para el caso de la llama no tienen ninguna importancia y adquieren aquí una relevancia especial.

Por un lado la superficie del tubo de grafito no es inerte y puede asumir un rol relevante en el proceso de atomización, equivalente a la presencia de oxígeno en el interior del horno, (que puede provenir de impurezas del gas raro, del solvente, de la matriz ó del ácido presente en la solución)<sup>94,95</sup>.

Estas reacciones en competencia: reducción por carbón y reoxidación por oxígeno, condicionan la concentración del metal libre y por ende la sensibilidad de la señal de absorción atómica con horno de grafito. De la misma manera que en la atomización con llama, es indispensable minimizar la concentración de óxidos estables con el fin de obtener una eficiencia de atomización elevada. Es por esto que la reducción en la concentración de oxígeno es sustancial para asegurar la óptima concentración de metal libre en el equilibrio, sobre todo en los casos en que los óxidos formados son refractarios a la temperatura de trabajo. Así, para cada analito en particular, se puede estudiar la modificación de la señal de absorción en condiciones de flujo de gas inerte ó bien en flujo detenido (stop flow) tal como se puede observar en los programas de calefacción del horno desarrollados con objeto de este estudio.

#### 4.2.3. Distribución de átomos en atomizadores electrotérmicos semicerrados.

La medición de la señal transiente producida por la absorción de la luz por parte de los átomos presentes en el horno se genera cuando la nube atómica intercepta el haz de luz. La cantidad de átomos presentes en la cubeta atómica condiciona la sensibilidad del método analítico y debe tender a un máximo. L'vov, en su intención de obtener un método absoluto de análisis que permitiera la eliminación de efectos de matriz en la calibración de un elemento puro, la estabilidad de calibración como función del tiempo, el aseguramiento de calibración idéntica para equipos de absorción atómica del mismo tipo, la posibilidad de recálculo y comparación cuantitativa de la calibración para varias condiciones de medición y la calibración teórica a través de constantes fundamentales, estudió básicamente el proceso de distribución de átomos en los atomizadores electrotérmicos y, sin alcanzar aún la situación ideal del método absoluto, logró resultados exitosos en términos de optimización de la sensibilidad y la repetitividad en las medidas de absorción atómica con este tipo de fuentes productoras de átomos<sup>96</sup>.

El primer trabajo con cubetas de grafito<sup>92</sup> mostró que el espesor efectivo de la capa absorbente de átomos a lo largo del eje del horno, suponiendo distribución uniforme de los mismos en la sección transversal en un dado instante "t", se relaciona con el número de átomos dentro del horno  $N(t)$  a través de la expresión:

$$\int_0^l n(x,t) dx = N(t)/S \quad (4.12);$$

donde "S" es el área de la sección transversal y "l" la longitud del horno.

Considerando que el gradiente de concentraciones de los átomos a lo largo del horno desde el centro a los extremos es una constante, el tiempo de residencia

medio de los átomos en el horno " $\tau_2$ ", se puede expresar en términos de su coeficiente de difusión "D" como:

$$\tau_2 = l^2/8D \quad (4.13)$$

Para poder asegurar la medición absoluta (ó en rigor aumentar la sensibilidad) se debía proceder a una rápida evaporación del analito de modo que la pérdida de átomos por difusión en el tiempo de atomización  $\tau_1$  fuera despreciable para lo cual:

$$\tau_1 \ll \tau_2 \quad (4.14)$$

En un trabajo previo<sup>97</sup>, L'vov había demostrado que el número máximo de átomos dentro del horno " $N_{\max}$ ", que correspondía al momento de vaporización total del elemento está relacionado con el número de átomos de analito introducido en el horno " $N_0$ " por la expresión:

$$N_{\max} = N_0 \eta(\tau_1/\tau_2) \quad (4.15):$$

donde  $\eta(\tau_1/\tau_2)$  es un factor que depende del cociente  $\tau_1/\tau_2$  y del modo de vaporización de la muestra. Con elevadas velocidades de vaporización se puede escribir:

$$\eta(\tau_1/\tau_2) = 2(\tau_2/\tau_1)^2 (\tau_1/\tau_2 - 1 + e^{-\tau_1/\tau_2}) \quad (4.16)$$

Cuando la condición 4.14 se cumple, el valor  $\eta(\tau_1/\tau_2)$  se aproxima a 1, y se obtiene el máximo valor del espesor efectivo de la capa atómica que se relaciona con la cantidad del elemento en la muestra por la relación simple:

$$\left( \int_0^l n(x,t) dx \right)_{\max} = N_{\max}/S = N_0/S \quad (4.17)$$

Merece tenerse en cuenta que la condición 4.14 es bastante difícil de obtener dado que, en condiciones normales de operación, el tiempo de residencia promedio de los átomos en el horno es una fracción de segundo. De allí que aparezcan soluciones al problema como aumentar la presión del gas inerte para

disminuir  $D$  y aumentar a segundos el tiempo de residencia y a la vez, disminuir el tiempo de vaporización proveyendo a la cabeza del atomizador un calentamiento adicional. Todas estas modificaciones redundan en un incremento en la señal analítica.

Otra consideración para llegar a optimizar la performance del método fue el modo de medición de la absorbancia a través del pico transiente, prefiriéndose la integración del pico (área) al método de la amplitud (altura).

El análisis del proceso de transporte de la muestra como un todo a través de la celda analítica muestra que, mas allá de la relación  $\tau_1$  a  $\tau_2$ , el valor integral  $Q_x$  se puede expresar a través del número total de átomos del analito introducidos en la celda  $N_0$  y el tiempo de residencia promedio  $\tau_2$  según:

$$Q_x = \int_0^{\infty} N(t) dt = N_0 \cdot \tau_2 \quad (4.18).$$

Substituyendo 4.17 en 4.12 se obtiene el valor integrado en espacio y tiempo de la señal analítica  $Q_{nl}$ , expresado en las unidades de espesor efectivo de capa absorbente:

$$Q_{nl} \cong \int_0^{\infty} dt \int_0^l n(x,t) dx = N_0 \cdot \tau_2 / S \quad (4.19):$$

y reemplazando  $\tau_2$  por su igual de la ecuación 4.13 se obtiene una expresión para la señal integrada que, mas allá de la teoría del método absoluto, permite ver en que condiciones de contorno se puede optimizar la señal de absorción obtenida en este tipo de atomizadores:

$$Q_{nl} = l^2 \cdot N_0 / 8DS \quad (4.20)$$

La única condición para la aplicación correcta de esta ecuación es que el tiempo de residencia promedio sea constante y por supuesto, el analito se volatilice

completamente. Además, se presupone que un dado tiempo "t" es válida una relación proporcional del tipo de la ecuación 4.21:

$$A(t) = C \int_0^t h(x,t) dx \quad (4.21):$$

donde C es un coeficiente determinado por constantes espectroscópicas y atómicas y por las condiciones experimentales.

La relación final entre el valor integral de la absorbancia y la cantidad de analito en la muestra tomará la forma:

$$Q_A \cong \int_0^{\infty} A(t) dt = C.l^2.N_0/8DS \quad (4.22)$$

ó bien:

$$N_0 = 8DS.Q_A/C.l^2 \quad (4.23)$$

El uso apropiado del método de integración presupone la cumplimentación obligatoria de las siguientes condiciones: tiempos de residencia constantes de los átomos en la celda durante la vaporización del elemento, completa vaporización del analito, y linealidad entre la absorbancia leída A(t) y el espesor efectivo de la capa de átomos.

De los requerimientos anteriores, el más importante y más difícil de satisfacer es la obtención de tiempos de residencia constantes de los átomos en la celda durante la vaporización del elemento. De hecho, la completa vaporización de un analito (excepto para aquellos de muy baja volatilidad) se puede asegurar aumentando la temperatura y el tiempo durante el cual se produce el calentamiento. Para el caso de los atomizadores semicerrados (no incluiremos aquí los abiertos tipo filamento de West por haber caído completamente en desuso) es necesario que el tiempo de residencia medio de los átomos en el horno ( $\tau_2$ ) permanezca constante, por lo que es necesario obtener isothermicidad temporal y espacial en el volumen total del horno. Ocurre que, si el tiempo de atomización



utilizado ( $\tau_1$ ) es largo, se produce una pérdida por difusión de los vapores a través de los agujeros del horno, de modo que siempre debe cumplirse que  $\tau_1 < \tau_2$ . El tiempo de residencia de los átomos en el volumen del horno depende de su longitud "l" y del coeficiente de difusión de los átomos "D" en la atmósfera inerte del gas de relleno de acuerdo a la ecuación 4.13. Asumiendo que la dependencia del coeficiente de difusión con la temperatura "T" a una presión de gas de relleno "P" se puede escribir como:

$$D = D_0(P_0/P).(T/T_0)^m \quad (4.24);$$

donde  $D_0$  es el coeficiente de difusión en condiciones normales ( $P_0, T_0$ ) y m un coeficiente que varía entre 1.5 y 2<sup>96</sup>, el único parámetro que puede influenciar el valor de  $\tau_2$  es la temperatura del horno:

$$\tau_2 = T^{-m} \quad (4.25).$$

Notese que aparece aquí la primer gran diferencia entre la cubeta de L'vov y los atomizadores comerciales que no utilizan este principio, es que el pulso transiente completo aparece dentro del ámbito de temperatura constante (equilibrio), mientras que en los atomizadores comerciales que no utilizan la cubeta, el punto de iniciación del pulso y su finalización corresponden a diferencias de temperatura de cientos de grados como se puede observar en la Figura 4.6. Este hecho afecta a la sensibilidad en absorción atómica con horno dado que no se puede hablar de que la zona absorbente sea isotérmica.

Obviamente el valor de absorbancia integrada dependerá del gradiente de temperaturas generado en el horno y será afectado por esta no uniformidad no solo temporal sino también espacial. Por ejemplo, un calentamiento no uniforme hace que los vapores de la muestra que se evaporan en el centro del horno difundan hacia los extremos y alcancen los agujeros de salida por condensación en las áreas más frías. Además, las zonas mas frías en los extremos provocan efectos de

memoria que obligan a un calentamiento adicional del horno después de cada medición.

#### **4.2.4. Medición en la zona de temperatura estabilizada.**

En la Figura 4.7 se muestran las distintas maneras de estabilizar la temperatura del horno. Observando en la parte superior de la Figura la posición del pulso de atomización vs. el incremento simultáneo de la temperatura del horno, se pueden ofrecer dos soluciones: a) correr el pulso hasta la zona de ámbito de temperaturas constantes y b) proporcionar un calentamiento pulsado del horno hasta la temperatura óptima de modo tal que el intervalo de tiempo en el que esto ocurra sea menor que la duración del propio pulso.

L'vov ha sugerido alternativas instrumentales para producir el "corrimiento" del pulso<sup>98</sup>.

- a) Soporte externo de la muestra de modo que sea introducida en el punto en el cual se ha alcanzado una temperatura prefijada y estable. Señala la importancia de secar y calcinar la muestra fuera del horno.
- b) El uso de una plataforma de grafito insertada dentro del horno donde se deposita la muestra

El uso de la plataforma ha tenido gran difusión dado que no requiere modificaciones en el diseño del horno y los resultados informados muestran una mejora en la sensibilidad. Explicaciones detalladas del proceso de atomización desde la plataforma se pueden encontrar en la bibliografía<sup>99,100</sup>.

Aquí sería conveniente aclarar que aunque la plataforma ha resultado una contribución inapreciable para la atomización isotérmica mejorando la sensibilidad y repetitividad de las medidas, no resuelve completamente el problema de la interferencia de la matriz, esto es las modificaciones al proceso de atomización

derivadas de la presencia de concomitantes que impiden predecir el comportamiento de un analito dado en cualquier medio. Esta es una de las causas por las que el problema del análisis absoluto no ha sido resuelto.

Paralelamente a los trabajos de L'vov relacionados con el corrimiento del pico de absorción, Ediger<sup>101,102</sup> muestra la posibilidad de corrimiento del transiente a través de la adición de una sustancia extraña al sistema dando el puntapie inicial para el uso de "modificadores de matriz" en la mejora de las condiciones de atomización. Este tema lo trataremos especialmente en otro apartado.

Otra manera de mejorar la performance en los tubos de grafito es calentarlos hasta la temperatura de equilibrio en un período de tiempo brevísimo, mas corto que la duración del propio pulso. Para lograr esto se requiere que  $\tau_2$  crezca usando tubos mas largos (a  $\tau_1$  constante) y  $\tau_1$  disminuya (a  $\tau_2$  constante) utilizando velocidades de calentamiento del horno mayores. Cualquiera de las dos alternativas requiere utilizar una potencia de entrada mayor.

L'vov ha considerado las diferencias entre la potencia de entrada en el comienzo del ciclo y despues de alcanzar la temperatura de equilibrio y ha establecido que mantener al temperatura prefijada requiere solo el 20% de la salida máxima de la fuente de poder. La mayor parte del tiempo, excepto en los primeros dos segundos donde se produce la elevación de la temperatura, la fuente opera parcialmente cargada. El autor utilizó por primera vez en 1977<sup>96</sup> una bateria de condensadores para el calentamiento preliminar del horno lo que eliminaba la necesidad de potencias de entrada mas grandes ya que la cantidad de energía requerida podía ser acumulada de la fuente de potencia de baja salida durante el

corto intervalo de tiempo (unos minutos) que transcurre entre medición y medición. Hoy en día<sup>61</sup> se utiliza el calentamiento capacitivo a través de un banco de capacitores propuesto por L'vov que, sumado al uso de grafito pirolítico anisotrópico, conduce a un incremento de temperatura de  $75\text{K} \cdot (10^{-3})\text{seg}^{-1}$ .

De todas maneras, cualquiera sea la velocidad de calentamiento, se ha mostrado que no es posible obtener una temperatura uniforme a lo largo de todo el horno<sup>103,104</sup>. La ausencia de condiciones isotérmicas en el momento en que el analito está siendo introducido en la fase gaseosa conduce a una atomización marcadamente dependiente de la matriz, lo que nos lleva nuevamente al tema "modificadores".

Resumiendo, podemos decir que para optimizar la sensibilidad en atomización electrotérmica es necesario **introducir rápidamente** todos los **átomos** de **analito** en la **fase gaseosa** y realizar la **medición instantánea** antes de que se verifiquen **pérdidas por difusión** a través de la pared del horno, ó procesos de **convección** y **expulsión** del vapor en el momento de introducción del líquido<sup>105</sup>.

También hemos visto que el **número** y **distribución** de átomos presentes en el camino óptico en el momento de la medida, es la resultante de una secuencia compleja de procesos que requieren conocer la **variación temporal** y **espacial** de la temperatura del gas y del horno para estudiar el transporte de masa, las reacciones en fase gaseosa y las reacciones químicas que pudieran existir luego del ciclo programado de calentamiento.

Además, el advenimiento del **procesamiento digital de las señales** ha permitido la **integración temporal** de los picos de absorción y con ello se han logrado avances en la teoría de atomización.

Si a esto le sumamos los últimos adelantos para la **corrección de señal inespecífica**<sup>61</sup>. (como por ejemplo efecto Zeeman) hemos compendiado la evolución en el tratamiento teórico-práctico de estos sistemas de atomización.

Si bien en nuestro estudio no hemos utilizado el sistema de plataforma para optimización de las medidas, el uso de señales integradas, la corrección de fondo por absorción inespecífica, de "modificadores de matriz" adecuados y de interrupción en el flujo de gases en el momento adecuado para disminuir la dilución, ha logrado compensar la imposibilidad de atomización desde plataforma.

Dado que la modificación de matriz ha sido empleada en la mayoría de las valoraciones realizadas, excepto en los casos en que, al no encontrarse el modificador adecuado se realiza la separación de interferencias, trataremos este tema seguidamente.

#### **4.2.5. Modificadores de matriz**

El modificador de matriz fue introducido por primera vez en la práctica en el año 1974<sup>101</sup> en el intento de diferenciar térmicamente la volatilización de los componentes de la matriz y la del analito. Se proponían dos mecanismos por los cuales actuaban estos modificadores:

- Formación de un compuesto mas volátil que el que posee la matriz mediante la adición de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (válido especialmente ante la presencia de halogenuros) aplicable en el caso de analitos poco volátiles a la temperatura de trabajo.
- Formación de un compuesto menos volátil en la fase de calcinación por adición de un modificador selectivo (por ejemplo  $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) usado cuando se desea "fijar" un analito demasiado volátil a la temperatura de trabajo.

En la actualidad se utilizan modificadores de matriz de distinta naturaleza y con diversos propósitos:

- inorgánicos:  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ , el difundidísimo  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  (al que se le atribuyen características de modificador universal) y/o mezclas de algunos de los anteriores.
- orgánicos: oxalatos, ascorbatos, EDTA, citratos, lactatos, etc.
- gaseosos:  $\text{H}_2$ ,  $\text{O}_2$ .

Los mecanismos de acción de estos modificadores están siendo discutidos en la actualidad y no se ha encontrado un consenso al respecto. De todas maneras, hemos incluido en el apéndice del presente capítulo, los últimos mecanismos propuestos para casos particulares.

Las aplicaciones de estos modificadores para matrices de distinta naturaleza han sido estudiadas extensamente y compendiadas en una revisión de Jackson y Mahmood<sup>106</sup>.

En nuestro trabajo hemos utilizado la absorción atómica con horno de grafito para la valoración de los metales: Pb, Cd, Cr (en todas las muestras estudiadas), Zn y Cu (en aquellas cuyos niveles de concentración fueran bajos para la utilización de la llama de combustión). Las variables que determinan la obtención de máxima señal fueron cuidadosamente analizadas y en consecuencia, se diseñaron los programas de horno, la adición de modificadores de matriz, la corrección de absorción inespecífica, etc. En los casos de interferencias serias de matriz y/o necesidad de preconcentración de la traza, se acoplaron sistemas en flujo que permitieron trabajar en línea, con automatización de las distintas operaciones como veremos en el próximo capítulo.

### 4.3. La generación de vapor.

Si bien el horno de grafito ha aportado un sin número de soluciones al análisis de vestigios metálicos (inclusive en micromuestras) tiene, tal como se desprende de sus características, una serie de desventajas que aún hoy no pueden ser salvadas.

La poca reproducibilidad en la inyección de muestra ha sido compensada por la incorporación de muestreadores automáticos pero, el proceso que lleva a obtener átomos es mucho mas lento que en la llama si se quiere que el proceso global resulte económicamente atractivo.

Si bien el entorno químico es muchísimo mas controlado, el horno no es completamente inerte y la formación de óxidos de difícil descomposición puede traer inconvenientes que obligan al uso de modificadores ó a la separación previa de la matriz en el peor de los casos.

Algunas veces el analito, ó los compuestos que se forman a partir de el, presentan una alta volatilidad que hacen que se recupere mal, lo que obliga a "corregir" las condiciones de atomización.

Dos ejemplos típicos de elementos "problema" para el análisis en llama y en horno de grafito son arsénico y mercurio. Los compuestos de arsénico y mercurio tienen una gran tendencia a formar óxidos en llama. (ver las ecuaciones descriptas en este capítulo en el apartado correspondiente) lo que hace que la cuantificación por esta vía sea poco sensible. Además, presentan en general, condiciones de volatilización semejantes a las de la matriz de muestra por lo que su recuperación en el análisis por horno de grafito es mala dado que se volatilizan junto con la matriz. Justamente la alta volatilidad de las especies  $Hg^0$  y  $H_3As$  es

la que se aprovecha para aislarlos de la matriz de muestra por generación del vapor que se transfiere a un tubo donde se mide la absorción.

Los generadores de vapor se parecen entre sí y difieren del horno en que la temperatura a la que se produce el vapor atómico es mas baja y en que las etapas "separadas" que llevan a la atomización del analito ocurren en "lugares distintos"<sup>107</sup> siguiendo el siguiente diagrama básico:

- a) Muestra + Reacción Química
- b) Analito (atomizado ó atomizable) gaseoso
- c) Celda atómica.

Con este diagrama proceden todos los métodos de generación de vapor pero antes de estudiar cada uno de ellos, veamos algunos aspectos a considerar:

- Al ser el primer paso, una reacción química en solución, el químico "maneja" este paso controlando las condiciones del medio.
- El hecho de separar al analito de la matriz permite "olvidarse" de la matriz en el momento de atomizar pero existe una limitación: la transferencia de masa. En muchos casos ésta es una etapa lenta y limitante de todo el proceso dado que el producto de la reacción química tiene que ser insoluble en la matriz.
- El proceso total debe realizarse en tiempos cortos.

La optimización de estos parámetros hizo que los métodos de vapor frío para Hg (CVAAS) y de generación de hidruros para As (HGAAS) se impusieran como métodos de valoración de estos elementos.

Un esquema típico de este tipo de generadores se observa en la Figura 4.5.

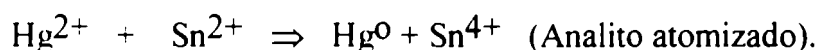


### 4.3.1. La reacción química.

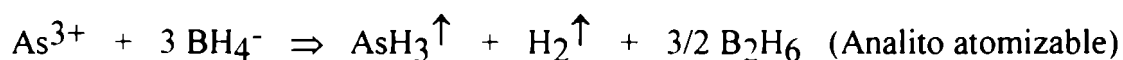
Se tienen que tener en cuenta los siguientes equilibrios:

- De formación de la sustancia: que debe proceder de manera que la reacción sea completa ó prácticamente completa.
- De descomposición de la sustancia formada: se buscarán las condiciones que la minimicen.
- De adsorción (antes ó después de la reacción química): se verificará que la adición de reactivos no produzca un sólido que, por ejemplo, pueda retener al analito.

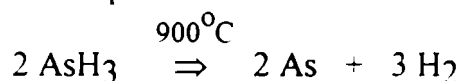
En el caso de Hg la reacción química genera directamente el vapor atómico del analito según la reacción:



En el caso de As la reacción química, en medio fuertemente ácido, genera  $\text{H}_3\text{As}$  (arsina) según<sup>108</sup>:



La arsina generada es transformada en átomos de As por acción de la llama de aire/acetileno sobre la que se monta el tubo de cuarzo.



Si el arsénico ingresara por aspiración directa al entorno químico de la llama de combustión aire/acetileno, los procesos de interacción con los compuestos de la llama (de los que hablamos al comienzo del capítulo) producirían especies moleculares difíciles de atomizar. Este hecho redundaría en el empobrecimiento de la señal y en la pérdida de la sensibilidad.

### 4.3.2. La transferencia de masa

No vamos a tratar aquí exhaustivamente el proceso de transferencia de masa pero sí tratar de entender los fundamentos que puedan llegar a ser de utilidad para optimizar la técnica analítica.

Para simplificar dividiremos el proceso en dos etapas: a) una transferencia de masa primaria que ocurre a través de una interfase y lleva al analito desde la solución a la fase gaseosa y b) una transferencia de masa secundaria que transporta el producto gaseoso formado hasta la celda.

#### 4.3.2.1. La transferencia de masa primaria

Una vez que el analito fue transformado en la especie química de interés es necesario que se produzca un cambio de fase, esto es que pase al estado gaseoso. Para lograrlo, debe tener una solubilidad bajísima. Suponiendo que la solución es ideal (lo que no está apartado de la realidad), se utiliza la ley de Henry:

$$P_i = K_h \cdot x_i \quad (4.26);$$

donde  $P_i$  es la presión parcial del analito,  $x_i$  su fracción molar y  $K_h$  la constante de Henry.

Si la concentración del analito está en el orden de la ppb, ( $x = 10^{-10}$ ), se deberá contar con sistemas que lleven  $K_h$  a valores de  $10^{10}$ , dado que esta será la fuerza impulsora de la transferencia de masa. Además el mecanismo por el cual el producto se libera es un problema cinético.

El proceso primario de transferencia de masa puede ser dividido en dos etapas: la formación del gas y la evolución del mismo. En tal sentido debe recordarse que la evolución del gas es un proceso de cambio de fase que lleva involucrada una nucleación que debe ser inducida (de la misma manera que cuando se promueve la precipitación de un sólido en solución raspando las paredes del tubo para promover la nucleación). Esta inducción consiste en proveer

superficies que sirvan de interfase como por ejemplo burbujas ó metales finamente divididos.

La etapa de evolución se beneficia por mecanismos de convección de la solución como puede ser: burbujeo de gases, agitación mecánica ó adsorción sobre ciertas superficies.

La relación existente entre la velocidad de transferencia de masa primaria y la velocidad del gas que arrastra al producto de la reacción (transferencia secundaria) es fundamental para obtener una buena sensibilidad<sup>109</sup>. Cuando el analito se separa de la matriz comienza a sufrir un proceso de dilución en el gas de arrastre durante su traslado hasta la celda. O sea que, si la velocidad de desorción es mucho menor que la de arrastre, el analito se diluye. La mínima dilución se obtendrá para una velocidad del gas de arrastre nula y vendrá dada por el volumen muerto de todo el sistema según la expresión:

$$D_1 = D_0 + Mv \quad (4.27);$$

donde  $D_1$  es la dispersión debida a la transferencia de masa primaria,  $D_0$  la debida al volumen muerto del equipo,  $M$  es una constante inversamente proporcional a la velocidad de transferencia de masa entre la solución y la fase gaseosa y  $v$  es el flujo de gas de arrastre.

$M$  incluye factores como la cinética de formación del gas, su difusión en la solución y la desorción producida por convección y puede ser representado (despreciando efectos de interfase) por:

$$M = 1/(k.dg. Kh) \quad (4.28);$$

donde  $k$  es una constante que contempla la cinética de formación y desorción del gas,  $dg$  es el coeficiente de difusión de la especie formada en la solución y  $Kh$  la constante de Henry. Esto implicaría que cuanto mas insoluble es el producto formado (mayor  $Kh$ ) la dispersión está regulada por el volumen muerto del equipo.

O sea que, la sensibilidad se verá aumentada en la medida que se lleve la velocidad del gas de arrastre a cero.

Como veremos al estudiar la transferencia de masa secundaria, esta selección es una situación de compromiso.

#### 4.3.2.2. La transferencia de masa secundaria

Este es el paso que provoca el máximo ensanchamiento de la señal típica en los sistemas de generación de vapor (ver Figura 4.9) y consecuentemente la disminución en amplitud por lo que lo estudiaremos en detalle. El transporte convectivo del analito por un gas de arrastre (carrier) es el método mas utilizado en estos sistemas.

Supongamos que el analito ha sido liberado cuantitativamente de un recinto ideal. Si la geometría del sistema y los flujos utilizados favorecen un perfil de velocidades laminar, es posible ver que la dilución que se le imprimirá a la muestra, sin importar el volumen muerto, tendrá una relación inversa con la velocidad del gas de arrastre, a mayor velocidad del carrier menor será la dilución que vendra dada por la difusión del producto gaseoso en el gas portador<sup>109</sup>.

$$D_2 = N/v \quad (4.29);$$

donde  $D_2$  será la contribución a la dispersión del proceso de transferencia de masa secundario,  $v$  es la velocidad del carrier y  $N$  es una constante que involucra al coeficiente de difusión del analito en el gas y a una constante  $G$  propia del sistema. (Si bien  $N$  no depende del volumen muerto, sí depende de la geometría del sistema de lo que da cuenta el factor  $G$ ).

$$N = b.dg'.G \quad (4.30);$$

$$G = a.l.r^2 \quad (4.31);$$

donde  $dg'$  es el coeficiente de difusión en la fase gaseosa,  $l$  es la distancia entre el generador y la celda atómica y  $r$  es el radio del tubo.

Si volvemos al proceso global de transferencia de materia, encontraremos un valor de dispersión total  $D$  que será la suma de contribuciones de los dos procesos:

$$D = D_o + Mv + N/v \quad (4.32).$$

Esta última ecuación es la misma que se utiliza para describir el mecanismo de ensanchamiento de un pico de cromatografía<sup>110</sup>, haciendo la salvedad que aquí consideramos un solo plato teórico y un perfil de señal no gaussiano (ver Figura 4.9). Se obtendrá un gráfico de dispersión de la señal en función de la velocidad del gas de arrastre que llevará a un valor de velocidad de arrastre óptimo que surge de la situación de compromiso referida mas arriba.

Si suponemos una situación ideal donde la transferencia de masa primaria fuera instantánea, se podría despreciar el segundo término de la ecuación 4.32 y hacer la velocidad del carrier lo más grande posible, controlando de este modo la dispersión total a través del volumen muerto del equipo por su geometría y el diseño del atomizador. En el otro extremo, si la transferencia de masa primaria es muy lenta deberíamos utilizar una velocidad de gas de arrastre muy baja.

En este último caso se ha optado por "separar" los dos procesos mediante sistemas de flujo discontinuos. Una vez que se produjo la liberación cuantitativa del analito, se envía un carrier que lo transporta.

La determinación de Hg por generación de vapor frío es un ejemplo de sistema "en etapas" porque la transferencia primaria es muy lenta. La determinación de As y demás elementos de su grupo a través de la generación de hidruros, es un ejemplo de transferencia instantánea por lo que no se trabaja en flujo discontinuo.

#### 4.3.2.3. El carry over: la transferencia de masa no deseada

El "carry over" es el arrastre aleatorio de pequeñas gotas de solución que llegan a la celda ó quedan en el camino pudiendo producir resultados espúreos ya sea por adsorción ó reacción en la trayectoria del analito hacia la celda, ó por dispersión de luz y consecuente aparición de estas señales no deseadas. Este proceso existe en sistemas en donde aparece burbujeo provocado, ya sea por un gas auxiliar ó por la propia reacción química, y debe ser evitado. Muchas veces, es necesario modificar la geometría y disposición espacial del generador en orden de disminuirlo aunque ello implique aumentar la dispersión.

La evolución de este tipo de atomizadores-generadores y su aplicación a todo tipo de matrices<sup>111-113</sup> se basa en la optimización de los dos procesos básicos: reacción química y transporte de materia con el objeto de lograr la máxima sensibilidad. En el presente trabajo se han estudiado cuidadosamente las variables (geometría del generador, geometría del atomizador, distancias generador-atomizador, velocidad de gas carrier), se ha realizado el control estricto de las reacciones químicas de generación así como los procedimientos para inducir cambios de fase en orden de optimizar la señal para los analitos Hg y As.

Por tal motivo era necesario escindir el proceso en dos partes: atomización de la muestra por calentamiento rápido en un soporte adecuado y medición de la absorción atómica en un volumen confinado mantenido a temperatura predeterminada. Este cuidado particular para evitar pérdidas de analito constituyó una de las grandes virtudes del método que aventajó en sensibilidad a otros modelos posteriores.

**Fig.4.1. Esquema de la estructura de una llama de flujo laminar.  
Zonas de reacción**

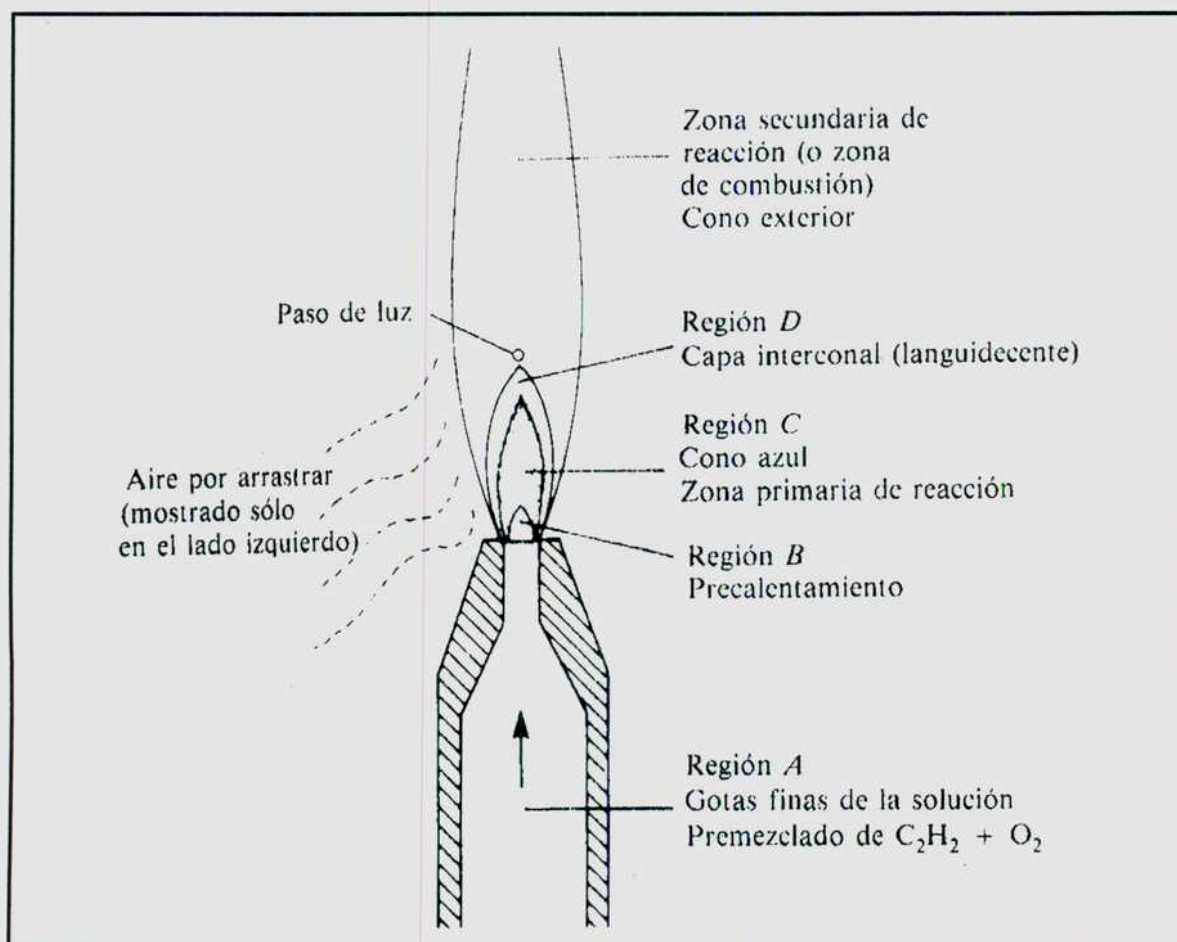
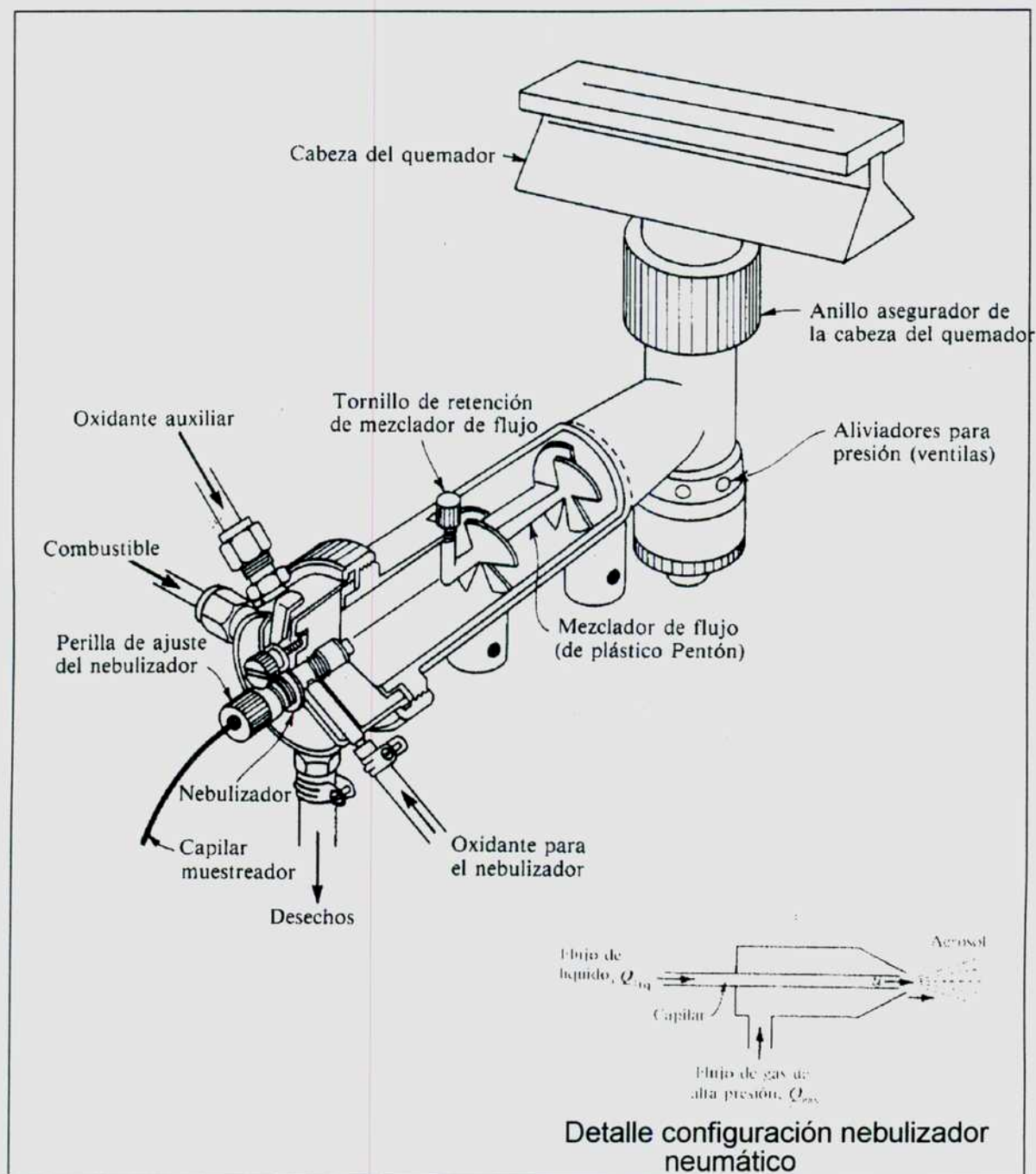
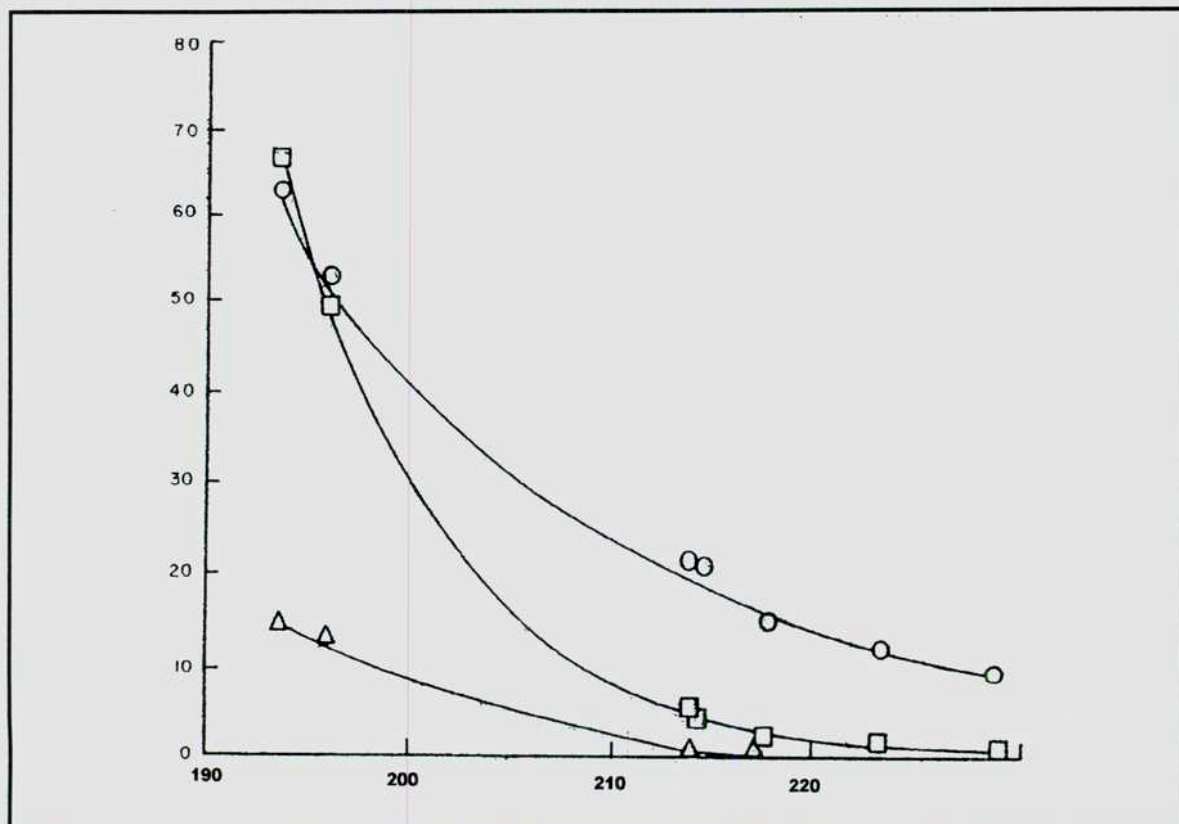


Fig 4.2. Sistema de nebulización-atomización

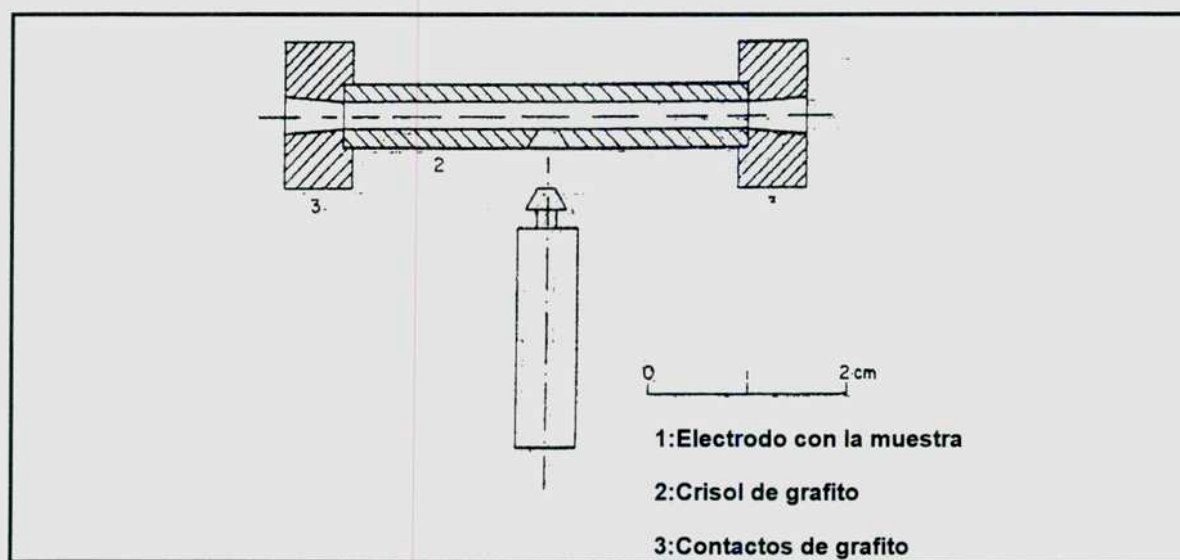




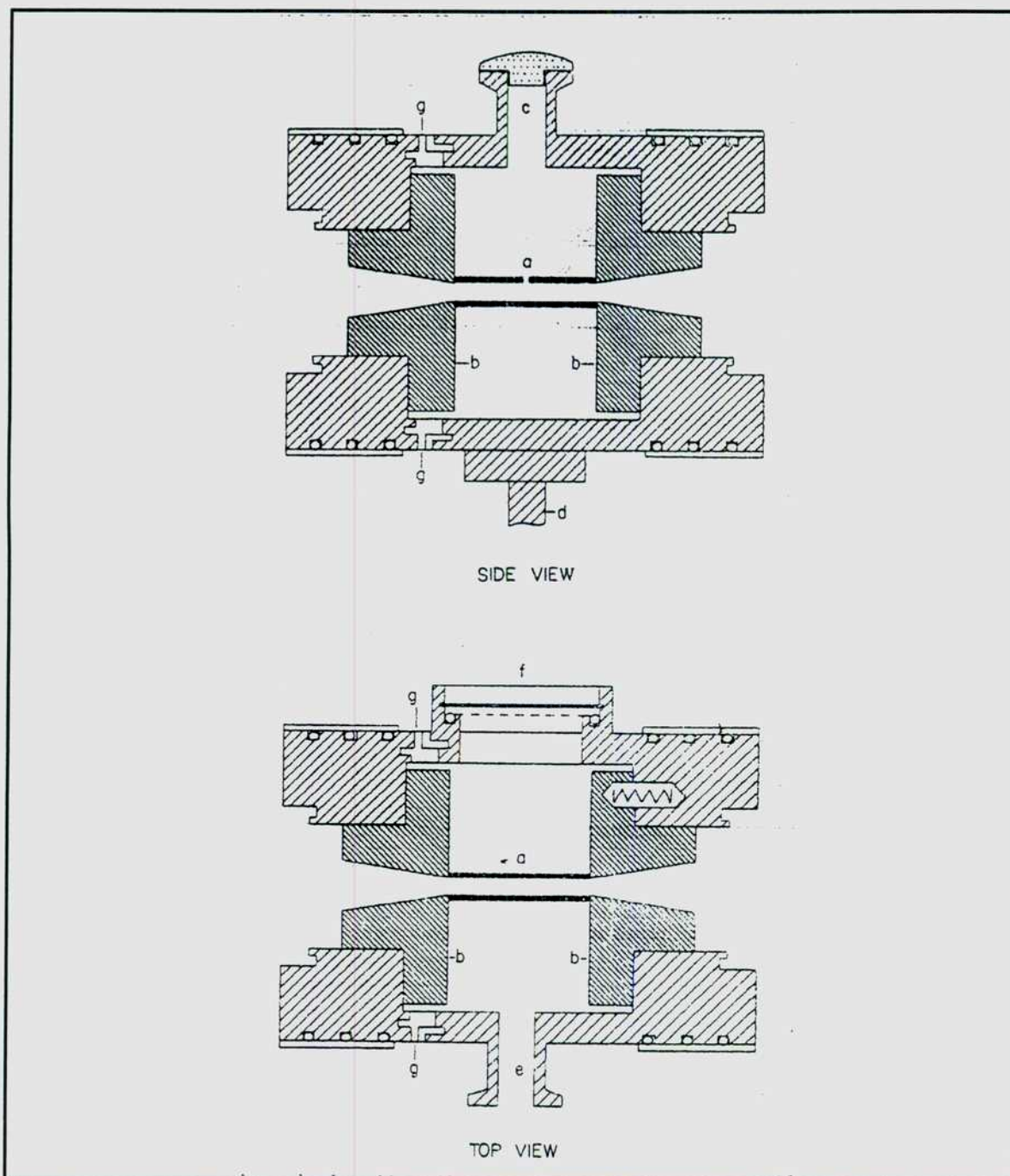
**Fig 4.3.**  
**Fondo de absorción de llama por debajo de 250 nm**  
**(o) aire acetileno; (□) aire hidrógeno; (▽) argón hidrógeno**



**Figura 4.4**  
**El sistema de atomización de la cubeta de grafito de L'vov**

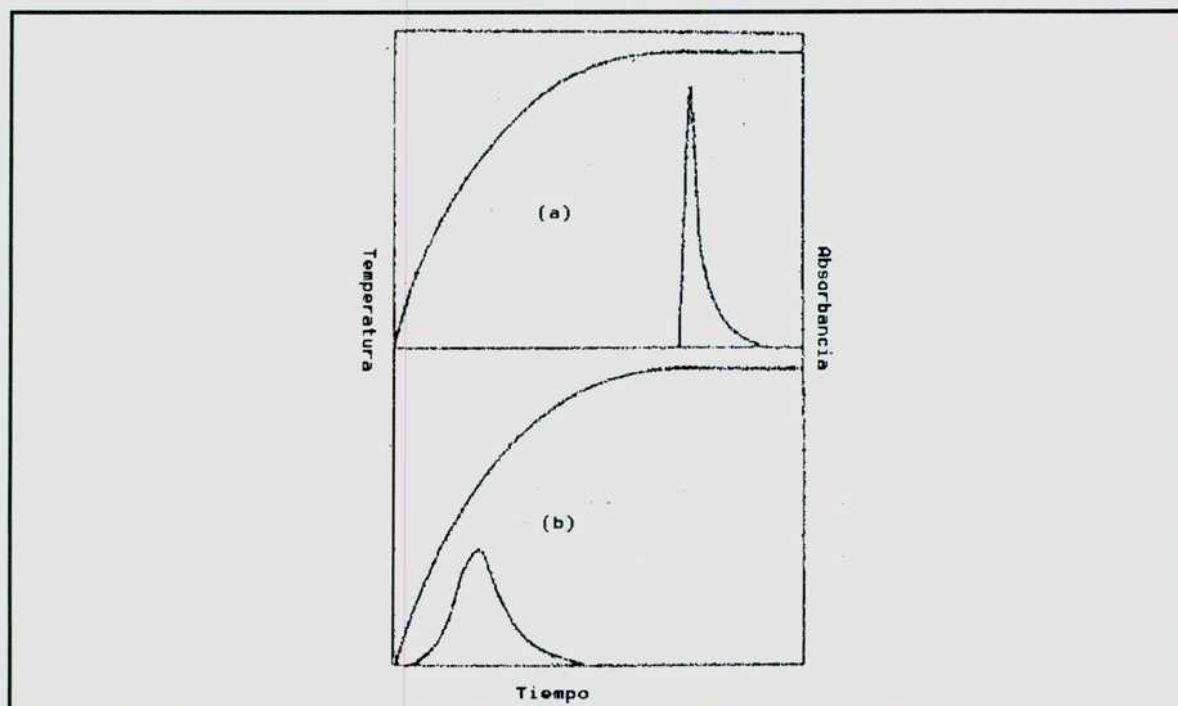


**Figura 4.5**  
**El horno de Massman**

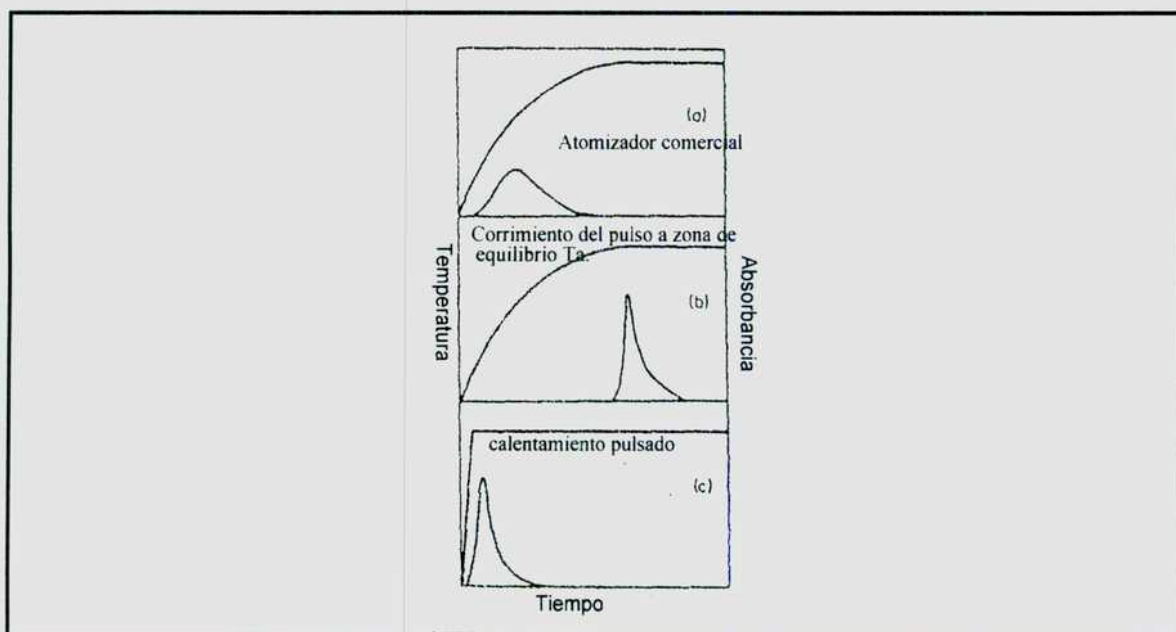


a: tubo de grafito; b: soportes de acero; c: puerta de entrada de muestra; d: soporte para montaja;  
e: entrada de argón; f: ventana de observación; g: aislación

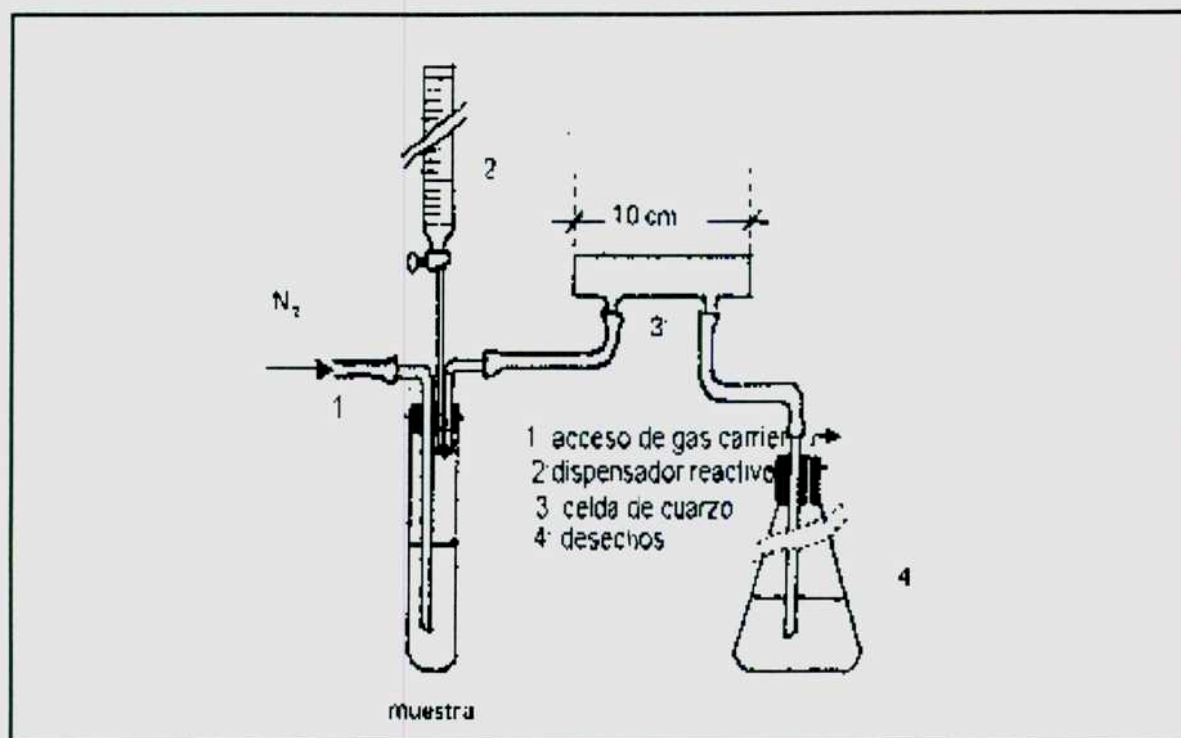
**Figura 4.6.**  
**Pulsos de absorbancia vs. variaciones de temperatura del horno**  
 (a) Cubeta de L'vov; (b) Otros atomizadores comerciales



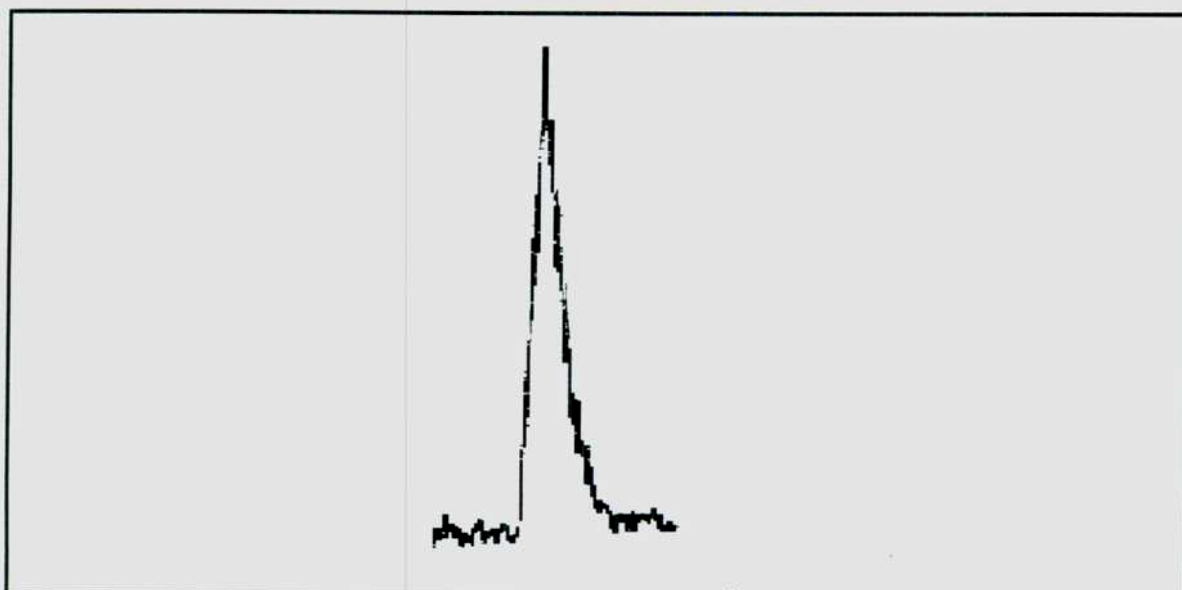
**Figura 4.7**  
**Formas potenciales de estabilización de temperatura del horno**



**Figura 4.8**  
Sistema generador de vapor para arsénico y mercurio



**Figura 4.9**  
Señal transiente típica para la valoración de arsénico por generación de hidruros





**Tabla 4.1**  
**Fracción de átomos libres en llama premezclada aire-acetileno**

Elemento	0-66	< 0-00001	< 0-0001	0-70	k		
Ag	0-66			< 0-00005			
Al	< 0-00001			0-40	0-63	0-76 <sup>k</sup>	
Au		0-26	0-21	0-0018		0-0031	0-0013
Ba	0-0011	0-0019	0-0034	0-0009			
Be				0-00005			
Bi				0-17			
Ca	0-14	0-069	0-052	0-066	0-07	0-070	0-083
Cd	0-50	0-77	0-80		0-38		0-070
Ce	0-41	0-13	0-023		0-28		
Cr	0-064	0-19	0-53	0-065	0-071		
Cu	0-98	0-38	0-40	1	0-88	1	1-19 <sup>k</sup>
Fe	0-66			0-38	0-84		0-51
Ga	0-16				0-16		
In	0-67	0-13	0-10		0-67		
K	0-25				0-32	0-28	0-34
Li	0-20				0-12	0-26	0-31
Mg	0-59	1-09	1-05	0-64	1-06	0-84	1
Mn	0-45	0-33	0-33	0-59	0-62	0-70	0-83
Na	1-00	0-68	0-63		1-04	0-53	0-63 <sup>k</sup>
Pb	0-44				0-77		0-57
Rb						0-16	0-19
Si					< 0-001		0-16
Sn	< 0-0001	0-009	0-061		0-043	0-078	0-092
Sr	0-13	0-087	0-068	0-075	0-063		0-060
Ti					< 0-001		
Tl	0-36				0-52		
V		< 0-0004	< 0-004		0-15		
Zn	0-45					1-10	1-31
Notas	a.c	b.f	b.g	a.c.h	a.i	a.c.i	a.c.i
							b.d.i

a) valores medidos por absorción integrada (continuo); b) valores medidos por absorción de pico (línea angosta); c) relativos a cobre (asumido como 1); d) relativos a magnesio (asumido como 1); e) mechero de 10 cm, aire-acetileno 5.6:1; f) mechero de 10 cm, aire-acetileno 7.0:1; g) mechero de 10 cm, aire-acetileno 5.6:1; h) mechero rectangular escudado en llama, aire-acetileno 9.0:1; i) mechero de 5 cm, aire-acetileno 9.8:1; j) mechero de 7.6 cm, aire-acetileno 7.85:1.

**Tabla 4.2**  
**Fracción de átomos libres en llamas premezcladas óxido nitroso-acetileno**

- a) Medido por absorción integrada (continuo)  
b) Medido por absorción de pico (línea fina)  
c) Relativo a Magnesio (asumido como = 1)  
d,e) Mechero 5 cm, % nitroso-acetileno, 2:1 y 1.8:1 resp.  
f,g) Mechero 7 cm, % nitroso-acetileno idem d,e.

Elemento					
Ag					0-57
Al	0-29	0-29	0-28	0-15	0-13
Au	0-17	0-15	0-48		0-27
B					0-0035
Ba	0-11	0-074	0-20	0-08	0-17
Be					0-093
Bi					0-33
Ca	0-50	0-34	0-94	0-76	0-52
Cd	0-67	0-60			0-56
Ce	0-13	0-11			0-25
Cr	1-00	1-02			0-68
Cu	0-54	0-49	0-68	0-38	0-66
Fe					0-83
Ga					0-73
In	0-45	0-37			0-93
K					0-12
Li			0-30	0-32	0-34
Mg	1-00	1-07	1	1	0-86
Mn	0-33	0-39	0-52	0-38	0-77
Na	0-31	0-32	0-23	0-44	0-97
Pb					0-84
Si					0-06
Sn	0-24	0-35	0-52	0-34	0-82
Sr	0-58	0-57			0-26
Ti			0-17	0-17	0-11
Tl					0-55
V			0-51	0-17	0-32
Zn	0-54	0-49	0-51	0-56	
Notas	b,d	b,e	a,c,f	b,c,f	a,g

# **CAPITULO 5**

## **Capítulo 5**

### **SISTEMAS DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO CONTINUO (FIA)**

Cualquier medida que se tenga que hacer en un laboratorio químico y que involucre el uso de líquidos (como en nuestro caso) requiere de una serie de operaciones como: manipuleo de la solución, detección del analito, colección de los datos y análisis de resultados tal como viéramos en el primer capítulo.

Existen obviamente computadoras ó detectores sofisticados que pueden ayudar al químico a realizar las dos últimas tareas, pero el manipuleo de la solución requiere que el analista posea una serie de habilidades que le permitan decantar, filtrar, disolver, pipetear, etc. que se realizan aún hoy en día, manualmente, con herramientas diseñadas hace mas de 200 años.

Evidentemente, pareciera no haber solución para la automatización del manejo de soluciones, y seguimos pensando en términos de operaciones en "batch" que además de consumir tiempo, pueden ser fuentes severas de error en el análisis. Sin embargo, hace ya unos 25 años se comenzaron a desarrollar sistemas analíticos basados en el manipuleo de soluciones (de muestra y de reactivos) en forma de corrientes continuas canalizadas en tubos de diámetro pequeño e impulsadas por bombas peristálticas con puntos de mezcla y/o separación y diversos modos de detección. Estos sistemas se pueden considerar como los precursores de los actuales sistemas de análisis por inyección en flujo (FIA).

Debido a que el estudio que nos ocupa involucra el análisis a nivel de vestigios sobre un gran número de muestras, se hace atractivo el manejo



automático de soluciones para disminuir la contaminación externa y aumentar la frecuencia de muestreo.

Las operaciones en flujo son mas fáciles de automatizar, dado que reemplazan el manejo mecánico en recipientes de todo tipo por **movimientos** secuenciales de **líquidos en tubos**. Son fáciles de miniaturizar usando tubos de diámetro pequeño, y los microvolúmenes utilizados se pueden manipular y medir a través de bombas de flujo. Estas operaciones son más fáciles de controlar en espacio y tiempo dado que el uso de tubería cerrada evita la evaporación de líquidos (de gran importancia en el momento de utilizar solventes orgánicos), proporciona "etapas" exactamente repetibles en el movimiento de las soluciones a medir, y además provee un ambiente de alta reproducibilidad para la mezcla de componentes y la formación de los productos de reacción.

La versatilidad de trabajar en flujo es evidente dado que, los flujos pueden ser mezclados, detenidos, reiniciados, revertidos, desdoblados, recombinados y remuestreados en tiempos que se controlan con precisión, permitiendo al mismo tiempo un uso de detectores y sensores de manera mas reproducible.

Mientras que muchas de las ventajas de las operaciones en flujo han dado excelentes resultados en las técnicas cromatográficas, ¿cuál es la causa por la cual el "batch" no ha sido reemplazado por sistemas en flujo en todas las áreas de la práctica de laboratorio?. La respuesta es "tradición", dado que los químicos estamos acostumbrados a pensar en términos de "mezcla homogénea" como única alternativa para tener una manera reproducible de que se "junten" los reactantes y obtener así, una medición reproducible.

No obstante esto, el concepto de análisis por inyección en flujo y su utilidad han ido cambiando y hoy en día, la potencialidad de esta técnica excede en mucho a las pretensiones de su diseño original: el análisis en serie automático<sup>114</sup>.

Desde el punto de vista académico ó de investigación la automatización se considera, desafortunadamente, como la mera "mecanización" de procedimientos ya conocidos que no ofrecen mucha oportunidad para innovar. Esto es cierto para los denominados analizadores en batch ó analizadores discretos<sup>115,116</sup> que emulan no solo la secuencia sino también el concepto de "operación individual" que utilizan los procedimientos manuales. Los sistemas en flujo son mas flexibles dado que el flujo de líquidos y los modelos de mezcla en las interfases de regiones con diferente concentración, ofrecen nuevas maneras de realizar el análisis químico<sup>117</sup>.

## 5.1 Fundamentos

El análisis por inyección en flujo (FIA) está basado en la **inyección** de una **muestra líquida** en una **corriente continua, no segmentada**, de una solución apropiada: **carrier**. La muestra inyectada se transporta a un detector que registra continuamente algún parámetro físico que cambia cuando la muestra pasa a través de una celda de flujo. Se diferencia del análisis en flujo continuo (SFA) en que este último utiliza segmentación por aire<sup>118</sup> que divide la corriente de solución en compartimientos separados por burbujas de aire, a fin de disminuir el entremezclado de muestras sucesivas. En este tipo de analizadores segmentados es necesario realizar un ciclo de lavado entre muestras y eliminar las burbujas de aire antes de que alcancen el detector.

Las características esenciales de los sistemas FIA son:

- El flujo no está segmentado por burbujas de aire.

- La muestra se "inyecta" ó mejor aún, se "inserta" directamente en el flujo en lugar de ser aspirada dentro de él.
- El "tapón" de muestra inyectado se lleva a lo largo del sistema y, además del proceso de transporte puede ocurrir un proceso fisicoquímico (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.).
- La dilución ó dispersión parcial del analito durante la operación de transporte puede ser manipulada a través del control de las características hidrodinámicas y geométricas del sistema.
- Un sistema de monitoreo continuo conduce a una señal transiente, la que es adecuadamente registrada.
- Como cuando se detecta la señal no se ha alcanzado ni el equilibrio físico (que implicaría la homogenización de una porción del flujo), ni el equilibrio químico (reacción completa), los sistemas FIA son considerados métodos automáticos de análisis del tipo "tiempo fijo".
- El tiempo de operación debe ser altamente reproducible dado que las medidas se hacen en condiciones de "no estabilidad" y pequeñas variaciones pueden conducir a alteraciones serias en los resultados.

A modo de resumen podemos decir que los sistemas FIA presentan cuatro características fundamentales:

- Flujo no segmentado
- Inyección de muestra directa
- Tiempo de operación reproducible
- Dispersión parcialmente controlada

### **Flujo no segmentado**

Aunque puede parecer que el único logro de los sistemas FIA es la ausencia de segmentación por aire, detallaremos seguidamente los principales

características que los diferencian del análisis por inyección en flujo continuo segmentado (SFA).

La presencia de burbujas de aire en el flujo es la diferencia principal entre ambas técnicas y una de las principales características de los sistemas FIA es su eliminación. Las burbujas de aire juegan tres roles importantes en los SFA:

- Prevenir la contaminación cruzada entre muestras
- Impedir la dilución ó dispersión del tapón de muestra que se inserta en el flujo.
- Generar un flujo turbulento por compresión de las burbujas por medio del cual se pueden alcanzar: el equilibrio físico (homogeneización de la zona comprendida entre dos burbujas) y el equilibrio químico (a través de la mezcla de muestra y reactivo).

Todos estos roles están en contradicción con los principios básicos de los sistemas FIA tal como hablábamos mas arriba, lo que los hace notoriamente distintos a los SFA.

### **Inyección de muestra:**

El propósito de inyectar la muestra es la de ubicar una "zona de muestra" perfectamente definida en una corriente móvil continua de manera tal que el movimiento de esta corriente no sea disturbado. La cantidad de muestra a introducir no necesita ser conocida exactamente, pero deberá ser inyectada con una precisión tal que, el volumen y la longitud de la zona de muestra en el punto de inyección, sea reproducible. O, tal como reitera Ruzicka<sup>119,120</sup> en sus primeros trabajos sobre el tema: "Lo que le pasa a una muestra, le tiene que pasar exactamente de la misma manera a la que le sigue".

Dado que inyectar una muestra en la solución de carrier es generar una zona de muestra definida que se dispersa de manera controlada en su camino hacia un detector, la operación exitosa de un sistema FIA requiere de un buen inyector. Los inyectores FIA son de dos tipos: basados en volumen y basados en tiempo.

Los inyectores del primer tipo han ido evolucionando desde el uso de una jeringa y una aguja hipodérmica<sup>119</sup> que "pinchaba" el tubo por donde corría el carrier<sup>1</sup>, pasando por válvulas deslizantes del tipo rotatorio de cuatro, seis u ocho canales tipo Rheodyne<sup>121,122</sup>. Si bien estas válvulas pueden ser diseñadas y fabricadas mecánicamente de maneras distintas, su funcionamiento se basa en los mismos principios. En la Figura 5.1 se puede observar el esquema de una válvula de inyección rotatoria de cuatro puertas ó canales para FIA. La válvula tiene dos posiciones, la de muestreo y la de inyección. Durante el primer estadio la muestra se llena en la cavidad volumétrica mientras que el carrier se deriva a través de un "bypass". Cuando la cavidad se llena con la muestra, ya sea manualmente ó a través de una bomba, la válvula se lleva a la posición de inyección y se la deja allí hasta que la muestra sea eliminada completamente de la cavidad e inserta en la corriente de carrier. La válvula de inyección de cuatro puertas consiste en una parte rotatoria que contiene dos "loops"  $L_1$  y  $L_2$  ( $L_1$  es la cavidad de muestra y  $L_2$  es el bypass) y otra fija donde se acomodan dos pares de canales hermanados. Cuando se gira la palanca de una posición a la otra, guiada por los dos topes fijos de la parte inferior, el "loop" de muestra ó el de bypass se hacen parte integrante del flujo de solución de arrastre. Obviamente, cambiando las dimensiones físicas del "loop" de muestra, se puede modificar la cantidad de muestra inyectada y, por

---

<sup>1</sup>Este tipo de inyección impedía trabajar con volúmenes constantes y afectaba la forma del "tapon" de muestra dependiendo de la velocidad de introducción de la misma.

ende, el factor de dilución. Esta válvula puede ser operada manualmente ó bien automáticamente a través del uso de un motor de a pasos.

Alternativamente, la válvula puede estar construída con dos partes fijas entre las cuales se ubica una rotatoria en forma de "sandwich". la cavidad de muestra puede estar inserta directamente en el rotor ó acoplada al mismo utilizando un "loop" de muestra externo. Este ingenioso diseño de inyector desarrollado en Brasil<sup>123</sup> y denominado "conmutador", ó modificaciones realizadas sobre este desarrollo básico, ha permitido a sus autores trabajar con sistemas FIA (adicionando confluencias para la adición de reactivos, reactores y columnas empacadas como luego veremos) en cualquier tipo de análisis con cualquier diagrama de flujo y con mínima perturbación del flujo de carrier<sup>124-126</sup>.

Este es el diseño de inyector que se ha utilizado en la mayoría de nuestros diagramas de flujo por lo que detallaremos su funcionamiento en la descripción de nuestras experiencias.

La inclusión de válvulas y conmutadores con un mayor número de canales apareados permite inyectar simultáneamente en mas de una zona expandiendo las posibilidades de los sistemas FIA. No describiremos aquí el funcionamiento de cada una de estas posibilidades, pero pueden consultarse en la revisión que han realizado Ruzicka y sus colaboradores sobre el tema<sup>127</sup>.

La técnica de inyección hidrodinámica<sup>128</sup> es otra alternativa para la inyección mecánica que ofrece la medida del volumen de muestra y su transferencia a la corriente de solución de transporte de manera reproducible, sin que esto implique el movimiento de partes mecánicas como en cualquiera de las válvulas que hemos descripto.

El principio de funcionamiento que se puede observar en la Figura 5.2 involucra que un volumen fijo de muestra, que se mide en un conducto de longitud  $L$  y radio interno  $R$  ( $a$ =muestreo) se propulse seguidamente hacia abajo a través de la corriente de carrier ( $b$ =inyección). Durante el ciclo de muestreo, la corriente de solución de transporte (carrier) se detiene y viceversa. Cuando se aspira la próxima muestra, la columna de solución carrier contenida en el conducto común  $L$  se vacía y deshecha junto con los excedentes de muestra. Este tipo de inyección se ha propuesto como una alternativa de inyección reproducible sin deterioro de partes mecánicas sometidas a continuos movimientos on-off.

Los procedimientos de inyección basados en tiempo<sup>129</sup>, son aquellos en los cuales el volumen de muestra se mide como función del tiempo, ó sea que el control del volumen inyectado se realiza por la medición de un intervalo de tiempo, el cual a constancia de diámetro y de velocidad de flujo es directamente proporcional al volumen. De esta manera, el volumen de muestra es controlado por microprocesador modificando el tiempo de inyección.

Los procedimientos basados en volumen, implican un cambio "físico" de las dimensiones del "loop" de muestra, tienen la innegable ventaja de ser independientes de la velocidad de flujo y por ello son inherentemente más precisos (la precisión en las inyecciones en tiempo depende de la constancia de la velocidad de flujo de carrier).

Las técnicas de preconcentración en línea utilizan, como veremos luego, combinaciones de inyección en base tiempo y en base volumen que definen el factor de concentración aplicado a la muestra cuando se trata de determinar vestigios.

Todas estas formas de introducir la muestra en sistemas FIA obligan a abandonar el concepto tradicional de "**señal en estado estacionario**" y permiten **aumentar** notoriamente la **frecuencia de muestreo** al mismo tiempo que **disminuir el consumo de muestra**.

### **Tiempo reproducible**

Como en otras técnicas analíticas, por ejemplo las que viéramos en el capítulo 4 (absorción atómica con atomización electrotérmica y absorción atómica con generadores de vapor), la respuesta del detector de un sistema FIA es una señal transiente que resulta de dos procesos consecutivos, uno de los cuales es tiempo-dependiente<sup>130</sup>.

Este tipo de señales transientes se obtienen en cromatografías gaseosa y líquida con un detector diferencial (común en estas técnicas). En este caso, los dos procesos involucrados son el transporte y la medición de la señal. En este sentido los sistemas FIA se pueden comparar al proceso cromatográfico aunque, en general, los primeros involucran además un tercer proceso (reacción química, extracción, etc.).

Los métodos de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETA-AAS) proporcionan una señal que se obtiene casi inmediatamente después de que la muestra se introduce en el horno de grafito y los dos procesos consecutivos son la producción del vapor atómico y la medición de absorbancia.

En los métodos analíticos basados en fenómenos quemiluminiscentes, los dos procesos son reacción química y formación de un compuesto fluorescente inestable.

En todos estos ejemplos, uno de los fenómenos (el tiempo-dependiente) origina la señal que se registra como un pico en el registrador.



En la Figura 5.3 podemos observar la señal transiente producida en un sistema FIA. Son gráficos de la señal analítica (absorbancia, intensidad fluorescente, potencial) en función del tiempo. Este señal, observada por el detector, es la resultante de los procesos consecutivos de los que hablábamos anteriormente y de las reacciones que hayan ocurrido desde el **momento de la inyección** hasta el **momento** en que la **zona de muestra pasa** por el **transductor**. Obsérvese que se ha hablado de "momentos" de manera que ha quedado explicitada la importancia que tiene la variable tiempo. El control de esta variable es de vital importancia en el desarrollo de sistemas FIA sobre todo cuando se desea "modelar" el sistema desarrollado. Los siguientes párrafos deben entenderse dentro de este contexto.

Las condiciones experimentales utilizadas en los sistemas FIA involucran, tal como viéramos al enunciar sus características distintivas respecto de los SFA, una mezcla incompleta del tapón de muestra inyectado en la corriente de solución transportadora lo que acarrea dos consecuencias importantes:

- La mezcla es tiempo dependiente, con lo cual tiene un grado diferente de extensión en puntos diferentes a lo largo de la línea de flujo.
- El grado de extensión de la mezcla es altamente reproducible de muestra a muestra.

De este modo, la técnica da origen a la creación de un gradiente de concentraciones de la muestra a lo largo de la corriente de solución de transporte que es tiempo-dependiente y obliga a trabajar en condiciones de tiempo reproducible. O sea, con un patrón de viaje inyector-detector, reproducible.

La pulsación de la corriente de carrier que se obtenía con los sistemas segmentados y que obligaba a mantener una longitud y diámetro de tubería dado y

encontrar un modelo de burbuja reproducible para obtener constancia en tiempos. es obviada totalmente en los sistemas no segmentados. Es más, la única fuente de pulsación en este tipo de sistemas es una bomba imperfecta. Además, como la muestra no atraviesa la bomba en su camino al detector, su paso por el sistema es definido, y la dispersión de la zona de muestra y el tiempo de residencia pueden ser elegidos en función de los requerimientos de la química involucrada.

### **Control de la dispersión**

La dispersión de la zona de muestra se define como "la dilución que sufre el volumen de muestra que se inyecta en la corriente de solución de arrastre". La dispersión se caracteriza por el perfil de concentración adquirido por un tapón insertado en un dado punto del sistema sin interrupción del flujo. Por razones prácticas, es interesante conocer las características del perfil cuando pasa por el detector. El registro obtenido a la salida del detector representa la dispersión en ese punto y se puede usar para evaluar el grado de dispersión del sistema. (Ver Figura 5.3).

Naturalmente, a medida que la zona se mueve con la corriente de solución de transporte se ensancha y cambia su forma asimétrica inicial hacia una forma mas simétrica, eventualmente gaussiana. Cambiando los parámetros de flujo, la dispersión se puede manejar con facilidad y adecuarla a los requerimientos analíticos de interés.

Recordando los parámetros de calidad de un método analítico de los que hablábamos en el capítulo tres, la dispersión podrá ser aumentada ó disminuída dependiendo del parámetro a optimizar. Por ejemplo el análisis de vestigios, como el de tóxicos metálicos en aguas, requiere dispersión mínima en orden de mejorar límite de detección y sensibilidad (el trabajo en condiciones de mínima dispersión

acerca la señal FIA a la de estado estacionario como veremos luego) . Por el contrario el análisis de componentes mayores, como el de concomitantes, puede requerir una expansión del ámbito dinámico de linealidad con lo que la dispersión podrá aumentarse. Los sistemas FIA utilizados con objeto del presente trabajo han hecho uso de ambas posibilidades a través del control del fenómeno de dispersión

Consideremos un procedimiento de dispersión simple. Una solución muestra que está contenida en una cavidad antes del momento de inyección es homogénea y posee una concentración original  $C^0$  la cual, de poder ser barrida por un detector, mostraría una señal cuadrada como la que se muestra en la Figura 5.4 (izquierda). Cuando la muestra se inyecta en forma de tapón, se genera una zona de muestra que sigue el movimiento de la corriente del carrier formando una **zona dispersa** cuya forma depende de la velocidad de flujo y de la geometría del canal. De allí que la curva de respuesta resultante (señal vs. tiempo) tenga la forma de un pico que refleja un continuo de concentraciones (ver la derecha de la figura), produciendo un gradiente en el cual ningún elemento del fluido tiene la misma concentración que el vecino. Es útil ver al continuo de concentraciones como si estuviera compuesto por elementos individuales del fluido, cada uno con una cierta concentración  $C$  (nótese que cada uno de estos elementos es una fuente potencial de lectura).

Para diseñar racionalmente un sistema FIA es necesario saber: a) como se diluyó la muestra original en su camino al detector y b) cuanto tiempo empleó en ese viaje<sup>131</sup>. Para este propósito se ha definido el coeficiente de dispersión  $D$  como el cociente entre la concentración de muestra antes y después del proceso de dispersión que ha tenido lugar en el particular elemento de fluido que ha dado origen a la señal leída.

$$D = C^0/C \quad (5.1)$$

Si la lectura de la señal corresponde a la medición en el máximo de altura del pico, la concentración de ese elemento imaginario del fluido,  $C^{\max}$ , se relaciona con  $C^0$ , obteniéndose el coeficiente de dispersión máximo  $D_s^{\max}$  según:

$$D_s^{\max} = C^0/C_s^{\max} \quad (5.2)$$

$D$  ó  $D_s$  se utilizan para calcular el coeficiente de dispersión de la muestra y  $D_r$  para el reactivo.

Aquí debe notarse que la definición de coeficiente de dispersión está considerando solamente el proceso físico de dispersión sin considerar reacciones químicas dado que  $D$  se refiere a concentraciones de la muestra antes y después de que "solamente" el proceso dispersivo ocurra. La manera mas simple de medir la dispersión física de un sistema dado es inyectar un volumen definido de un colorante en una solución de transporte incolora y monitorear continuamente la absorbancia con un espectrofotómetro.

Cuando al sistema FIA se adicionan además especies químicas que reaccionarán con la muestra, se incorpora además un proceso de dispersión química resultante de la interacción muestra-reactivos que aumentará consecuentemente el valor de  $D$ .

O sea que la señal FIA, definida como la señal transiente observada por el detector durante el pasaje de la zona de muestra dispersada, tiene la forma de un pico cuya altura, ancho y área contienen la información analítica y es el resultado de dos procesos cinéticos que ocurren simultáneamente: el físico y el químico. El proceso físico se reproduce perfectamente para cada inyección lo cual no significa que se obtenga una mezcla homogénea sino una dispersión que da como resultado un gradiente de concentraciones.

El coeficiente de dispersión  $D$  es un concepto ficticio, similar al de plato teórico en cromatografía, dado que no corresponde a ninguna "concentración real" dentro de la zona de muestra dispersada. La razón es que una zona de muestra dispersa no está constituida por elementos discretos de fluido y es "imaginada" por el detector, a un tiempo dado, como una sección discreta del gradiente de concentración que está sensando.

De esta manera, mientras que un detector espectrofotométrico integra sobre el ancho y largo de la celda de flujo, un electrodo de ión selectivo sensa solo la capa de solución adyacente integrando el potencial sobre la superficie completa del electrodo. Esto hace que el coeficiente de dispersión sea un parámetro FIA conveniente dada sus características normalizadas.

De lo anterior, surge que el valor de  $D$  está relacionado siempre con un tiempo " $t$ " que es el tiempo transcurrido entre el punto de inyección " $t_0$ " y el momento en que un elemento de la muestra dispersada pasa por el detector. De esta manera, en el máximo del pico se define  $D_{\max}$ , que se relaciona con el valor " $T$ " o tiempo de residencia (correspondiente al máximo de señal) (Ver Figura 5.3) y que resulta significativo por dos motivos: i) como intervalo de tiempo que nos permite identificar y seleccionar el elemento de fluido que será la fuente de nuestra lectura; ii) como el tiempo disponible para que las reacciones químicas que permitirán la detección (en los casos que se requiera) puedan proceder.

Las formas de controlar el proceso de dispersión, ya sea física como química en FIA, podrán ser discutidas luego que veamos el principio de funcionamiento de los sistemas básicos.

## 5.2 . Principios de funcionamiento.

El analizador en flujo mas simple que se conoce (ver Figura 5.3) consiste en:

- una **bomba** que se utiliza como unidad propulsora y que permite fluir a través de un tubo angosto (a un flujo dado tan constante como sea posible) una ó varias soluciones que podrán actuar como transporte (carrier) ó ser solamente reactivos disueltos en un solvente adecuado.(A veces se pueden utilizar reactivos sólidos y disolución en flujo como proponemos en el capítulo 6).
- un **sistema de inyección** que permite la inserción reproducible de una cantidad exacta de muestra en el flujo de solución de transporte sin interrupción del mismo.
- Un tubo largo, comunmente llamado **reactor** (a veces impropriamente) a lo largo del cual tiene lugar la operación de transporte con ó sin procesos adicionales. El rol de reactor puede ser cubierto por un tubo recto ó helicoidal, ó una cámara de mezcla, ó un tubo empacado con un material químicamente activo (resinas de intercambio, enzimas inmovilizadas, etc.).
- Una **celda de flujo** ubicada en un **detector** (potenciómetro, fluorómetro, colorímetro, etc.) que transduce alguna propiedad del analito en una señal continua que se envia a un **registrador** ó computadora.

En la Figura 5.3 se puede observar el pico FIA y los parámetros que lo caracterizan, altura H, ancho W, área A (relacionadas con la concentración del analito), tiempo  $t_b$  que representa al ancho del pico en la línea de base y el tiempo de residencia T durante el cual tiene lugar la reacción analítica y que condiciona la frecuencia de muestreo. Valores típicos de T van de 5 a 20 seg., lo que lleva a un

ciclo de muestreo de aproximadamente 30 seg ( $T + t_b$ ) y a una frecuencia de análisis de 2 muestras por minuto. Los volúmenes de muestra inyectados varían entre 1 y 200  $\mu\text{l}$  (los típicos son de 25  $\mu\text{l}$ ) lo que hace que no se necesiten mas que 0.5 ml de reactivo por ciclo completo de muestreo.

### 5.2.1. Obtención de la información analítica

La altura de pico es la dimensión usada mas frecuentemente dado que relaciona directamente la respuesta del detector, por ejemplo absorbancia, potencial, corriente, etc. con la concentración del analito a traves de la ecuación:

$$H = k.C \quad (5.3);$$

donde  $k$  es una constante de proporcionalidad.

Además, en lugar de medir alturas entre el máximo del pico y la línea de base, se puede realizar una medición vertical en porción ascendente ó descendente del pico que puede ser explotada en las denominadas técnicas en gradiente<sup>132,133</sup>.

Estas técnicas se caracterizan por utilizar un coeficiente de dispersión  $D_g$ , diferente al del máximo de la curva  $D_{\max}$ . O sea que si  $C_0$ ,  $C_{\max}$  y  $C_g$  son las concentraciones iniciales, en el máximo y en algún punto  $g$ , respectivamente, se puede definir  $D_{\max} = C_0/C_{\max}$  y  $D_g = C_0/C_g$ . Por definición, el mínimo coeficiente de dispersión es el que corresponde al máximo de la curva con lo cual  $D_{\max}$  es menor que  $D_g$ , lo que motiva que las técnicas en gradiente trabajen en condiciones que no sean las de máxima sensibilidad. Este concepto extiende las posibilidades de los sistemas FIA, en especial en aquellos donde ocurren varias reacciones químicas entre los reactivos y los componentes de la muestra. Se pueden realizar mediciones antes o después del tiempo de residencia " $T$ " (ver Figura 5.3) lo que obliga a utilizar temporizadores y/o microcomputadoras para realizar las medidas sin errores significativos. Las alternativas analíticas son múltiples como por ejemplo: calibración a través de una sola curva característica<sup>132</sup>, titulometrías por

sistemas FIA<sup>134</sup>, determinaciones simultaneas basadas en gradientes de pH<sup>135</sup>, etc..

La medición de concentraciones a través de área ó de ancho de pico son menos difundidas en los sistemas FIA dado el carácter integral de la primera, que la hace poco útil para lecturas con detectores del tipo logC (ión selectivo) y la poca precisión de la segunda que está basada en medidas horizontales que se utilizan solo cuando se requiere trabajar con ámbitos dinámicos lineales muy expandidos.

### **5.3. Variables que afectan la señal FIA: Aspectos teóricos relacionados con el fenómeno de dispersión.**

El diseño de un sistema de flujo depende del tipo de análisis que se requiera, dado que a través de modificación de variables como geometría del sistema, velocidad de flujo de solución de transporte y de soluciones reactivas, longitud de reactores, etc., se puede controlar la dispersión y consecuentemente, las características de la curva de respuesta. De esta manera se requerirán sistemas en flujo con dispersión mínima ( $D < 3$ ) para realizar análisis de microcomponentes, sistemas de flujo con dispersiones mayores para expandir ámbitos de linealidad, etc.. Al mismo tiempo, para obtener máxima frecuencia de análisis, se tratará de tener el tiempo de residencia de la muestra que sea lo mas breve posible modificando inteligentemente las variables de las que hablábamos mas arriba.

Estas variables modifican el tipo y el grado de dispersión por el cual trataremos de acercarnos a la/las expresiones que condicionan esta última. En un recipiente con flujo estable se pueden visualizar dos patrones de flujo que representan los dos extremos: el que supone que la muestra se mueve como un



"tapón" ó flujo "plug". ó el que supone mezcla completa ó "mix". En realidad ninguno de estos modelos se desarrolla completamente, y el flujo resultante contiene diferentes proporciones de estos dos tipos de flujo ideales. Para la descripción del tipo de flujo se necesita conocer la distribución de los tiempos de residencia de las moléculas individuales (ó elementos de fluido) dentro del reactor de flujo y llegar a una expresión cuantitativa de la dispersión que considere los procesos de transporte convectivos y difusionales de los que hablaremos seguidamente.

### Procesos de transporte en sistemas FIA

A pesar de que los primeros trabajos en FIA<sup>117</sup> hablaban de la necesidad de un flujo turbulento para evitar la contaminación cruzada entre muestras sucesivas que se inyectaban en una corriente de solución de transporte, se pudo verificar rápidamente que el número de Reynolds es menor que 2000:

$$Re = 4\rho Q/\pi 2R\eta \quad (5.4);$$

donde  $\rho$  es la densidad en g/ml,  $R$  es el radio del tubo,  $Q$  es la velocidad de flujo volumétrico (de bomba) y  $\eta$  es la viscosidad en poise. Un sistema FIA típico que trabaje a velocidad de flujo entre 0.5 y 3 ml/min tiene un valor de  $Re$  del orden de 20-130 y corresponde a un flujo laminar. Este flujo laminar le otorga a los sistemas FIA ventajas en la forma de zonas bien definidas y bajo consumo de reactivos.

Se puede decir que existen dos mecanismos que contribuyen a la dispersión de la muestra inyectada:

a) el transporte **convectivo** que ocurre en condiciones de flujo laminar y conduce a un perfil de velocidades parabólico con moléculas en las paredes del tubo que poseen velocidad lineal cero y moléculas en el centro con velocidades

del doble de la promedio. (Este fenómeno es bastante bien conocido por los pescadores: cuando quieren moverse en la dirección en que avanzan las aguas en un río se mueven por el medio mientras que para regresar, utilizan las orillas).

b) el transporte **difusional** debido a la presencia de gradientes de concentración en el régimen de transporte convectivo que da origen a difusión de tipo **axial** y **radial**. El primero, debido a gradientes de concentración horizontales en los bordes delanteros y traseros de la zona de muestra inyectada, contribuye muy poco a la dispersión total. El segundo, que aparece como resultado de diferencias de concentración en dirección perpendicular al flujo, contribuye de manera muy importante.

Si se considera que el flujo está constituido por un gran número de cilindros de fluido superpuestos que viajan convectivamente a distintas velocidades, la difusión radial tiende a balancear las concentraciones de manera que las moléculas de las paredes del tubo se muevan hacia el centro mientras que las del centro viajen a la pared. Este proceso es importante porque cada muestra que se inyecta mantiene su integridad. En rigor, este movimiento aminora el transporte convectivo, impidiendo de este modo la dilución progresiva de la zona de muestra en la corriente de solución transportadora. Se puede suponer que la difusión radial juega un rol bastante parecido a las burbujas de aire en los SFA.

Existe un tercer tipo de transporte, originado por gradientes de densidad, que aporta poco porque las diferencias de densidad entre el fluido y la zona de muestra son, en líneas generales, despreciables.

El perfil de concentraciones de una zona de muestra que se inyecta en una corriente que fluye es dependiente del tiempo, como lo son las contribuciones de los diferentes tipos de transporte.

Cuando la muestra se inyecta en el flujo de solución de transporte no hay dispersión. Inmediatamente después de la inyección el perfil es parabólico y el transporte convectivo. El registro de la señal daría una curva con una porción inicial vertical (salida de las moléculas que están a la cabeza de la parábola) y una "cola" correspondiente a la porción retrasada. Esta situación se da solamente para tiempos muy breves no utilizados habitualmente en los sistemas FIA. Como la cabeza de la parábola viaja al doble de la velocidad promedio, el tiempo de viaje  $t = L (longitud\ total\ del\ tubo) / 2 F (velocidad\ lineal\ de\ flujo)$ .

Esta situación ocurre solamente cuando  $t$  es muy breve, lo cual no es común en FIA. En estas condiciones  $t = T$ .

Después de un intervalo de tiempo corto, aparece una contribución significativa de la difusión radial que compite con el transporte convectivo. El progreso de la zona central se aminora respecto de la porción de atrás. Ambos fenómenos ocurren simultáneamente y la señal transiente registrada en estas condiciones tiene una porción inicial casi vertical ( $t \neq T$ ) y una cola que marca la vuelta a la línea de base. El tiempo de viaje  $t$  es marcadamente dependiente del radio del tubo ( $R$ ) y del coeficiente de difusión molecular ( $D_m$ ).

Si el tiempo de viaje es lo suficientemente largo, la contribución de la difusión radial excede al transporte convectivo. El perfil de la zona inyectada es mas compacto, aunque la distorsión debida a la mayor velocidad lineal de las moléculas en el centro del tubo continua presente. La señal es prácticamente gaussiana y cumple con que el tiempo que se requiere para que el "tapón" de muestra atraviese el detector  $t_b = 2(T - t)$ . En estas condiciones  $T = L/F$ , pero, estas últimas son obtenidas rara vez, dado que se necesitan reactores muy largos y/o velocidades de flujo muy bajas.

Concluyendo, para las condiciones habituales en los sistemas FIA, el transporte está gobernado por una combinación de procesos de convección-difusión. La dispersión ó dilución de la muestra crece cuando aumenta el tiempo de residencia (condición que es válida hasta ciertas condiciones experimentales<sup>136</sup>). La señal registrada no es gaussiana y el perfil no puede ser definido en términos de distribución normal aunque algunos autores hacen aproximaciones basadas en este hecho.

La ecuación que mejor describe el perfil de concentraciones generado por el "tapón" de muestra homogénea que sufre procesos combinados de difusión y convección, y, consecuentemente, la dispersión física total se puede escribir como<sup>137,138</sup>:

$$D_m (\delta^2 C / \delta x^2 + \delta^2 C / \delta r^2 + 1/r.(\delta C / \delta r)) = \delta C / \delta t + 2F(1-(r^2/R^2))\delta C / \delta x \quad (5.5);$$

donde  $D_m$  es el coeficiente de difusión molecular,  $C$  es la concentración,  $x$  es la distancia recorrida a lo largo del tubo,  $r$  es la distancia radial respecto del eje del tubo,  $R$  es el radio del tubo y  $F$  es la velocidad lineal de flujo promedio.

Esta ecuación está derivada de la aplicación de un balance de masa a un elemento diferencial de volumen en el fluido y tiene en cuenta los gradientes de concentración axial y radial, así como los perfiles de flujo bajo condiciones de régimen laminar. El lado izquierdo corresponde a transporte difusional, el primer término entre paréntesis representa difusión axial (dependencia de  $C$  con  $x$ ) y los otros dos la difusión radial (dependencia de  $C$  con  $r$ ).

El primer término de la derecha corresponde a acumulación de materia en regimen no estacionario como en nuestro caso, y el segundo tiene en cuenta la contribución del transporte convectivo que genera el perfil parabólico del que hablábamos mas arriba. Nótese que para moléculas en la pared del tubo ( $r=R$ ) la

velocidad es nula. mientras que en el centro ( $r=0$ ) es el doble de la velocidad lineal promedio  $F$  tal como dijéramos mas arriba.

Sin embargo, la curva de respuesta FIA es la resultante de la dispersión física de la que hablamos extensamente, a la que hay que sumarle la dispersión química (en los casos que corresponda) provocada por el proceso químico de formación de un producto como resultado de una reacción. Estos dos procesos, de naturaleza cinética<sup>139</sup>, ocurren simultáneamente, y contribuyen **significativamente** a la dispersión total "D" definida por Ruzicka con el término  $D_{\text{transporte}}$ . Además hay que agregar a esta expresión la dilución incorporada al sistema por la geometría de la celda de flujo a la que denominaremos  $D_{\text{detector}}$ , y una tercer componente relacionada con la dispersión debida al volumen de muestra y el diseño geométrico del sistema al que llamaremos  $D_{\text{inyección}}$ . Se obtiene una expresión dada por:

$$D = D_{\text{inyección}} + D_{\text{transporte}} + D_{\text{detector}} \quad (5.5)$$

Resumiendo, podemos decir que los factores que afectan esta curva de respuesta y por ende la señal en un sistema de flujo son múltiples y, en orden de optimizarlo desde el punto de vista práctico, los estudiaremos en detalle.

### 5.3.1. Influencia del volumen de muestra

Consideremos el sistema FIA sencillo que viéramos en la Figura 5.3 en el cual la velocidad de bombeo es "Q", la longitud del tubo es "L", y su diámetro interno es "d". Si inyectáramos volúmenes crecientes de un colorante y registráramos espectrofotométricamente la curva señal vs. tiempo, obtendríamos una serie de curvas, sobreimpuestas partiendo del mismo punto de inyección S. (ver Figura 5.5 izquierda) donde la altura de los picos crece hasta el límite superior de "estado estacionario" que corresponderá a la concentración del colorante sin

diluir  $C^0$  y a un coeficiente de dispersión  $D=1$  (es equivalente a registrar la señal del colorante cuando circula por el canal de carrier).

El estudio cuidadoso de las mismas permite decir que:

- a) el tiempo recorrido,  $t$ , no depende de el volumen de muestra inyectada (El punto de elevación de todas las curvas coincide).
- b) el tiempo de residencia  $T$  aumenta con el volumen inyectado.
- c) el tiempo línea de base a línea de base,  $t_b$ , aumenta con el volumen de muestra.
- d) el coeficiente de dispersión  $D$  decrece a medida que el volumen de muestra aumenta. (De acuerdo a Ruzicka<sup>131</sup>,  $D$  y  $V_s$  (volumen de muestra) son inversamente proporcionales).

Para volúmenes de muestra muy grandes, hay una porción del tapón que no es sometido a dilución y la muestra que pasa a través del detector presenta una señal en el máximo que corresponde a la concentración original y  $D=1$ . (Nótese que cuanto mayor es  $V$ , mayor se hace  $t_b$  y la señal tiende a la del estado estacionario).

De lo anterior podríamos llegar a deducir que el uso de grandes volúmenes es siempre de interés en cualquier sistema FIA. Sin embargo, cuando ocurre una reacción química entre el carrier y la muestra, se favorece la aparición de un doble pico al inyectar volúmenes grandes en condiciones en que se hubiera obtenido un solo pico en ausencia de reacción química. Ese doble pico surge de los gradientes de concentración generados por la reacción química en ambas interfases: estos gradientes favorecen las fuerzas difusionales cuando la reacción química causa una disminución en la concentración de los compuestos inyectados. Tal como veremos en el capítulo 6, en el presente estudio hemos trabajado sobre los reactivos de manera de evitar este desdoblamiento.

### 5.3.2. Influencia del diámetro y longitud del reactor y de la velocidad de flujo.

De manera de predecir de una manera práctica y conveniente la influencia de la longitud y diámetro del reactor y de la velocidad de flujo que se utilizan en los sistemas FIA de línea única (Ver Fig. 5.3), Valcarcel<sup>140</sup> obtuvo ecuaciones empíricas relacionadas con estos parámetros que le permitieron establecer conclusiones sobre su influencia en el tiempo de residencia  $T$ , tiempo línea de base a línea de base  $t_b$ , tiempo de recorrido  $t$  y coeficiente de dispersión  $D$  a través de las ecuaciones que siguen:

$$t = 0.465.d^{0.950}.(L/Q)^{0.850} \quad (5.6)$$

$$t_b = 56.474d^{0.293}.L^{0.107}.Q^{-1.057} \quad (5.7)$$

$$T = 0.840.L^{0.801}.d^{0.683}.Q^{-0.977} \quad (5.8)$$

$$1/D = 0.427.L^{-0.167}.Q^{0.206}.d^{-0.496} \quad (5.9)$$

donde  $L$  es la longitud del tubo,  $d$  su diámetro y  $Q$  la velocidad de bombeo de la solución de transporte.

La utilidad práctica de cada una de estas ecuaciones se refleja en el diseño de los sistemas FIA que se han utilizado en nuestro trabajo.

Generalizando respecto de cada uno de los parámetros podemos decir que si se desea una dispersión baja ( $D < 3$ ) el canal FIA consistirá en una pieza lo mas corta posible de un tubo angosto conectado entre el inyector y el detector. Aún si se requiere dispersión media ( $3 < D < 15$ ), es económico utilizar canales muy angostos dado que se ahorran muestra y reactivos (a  $Q$  constante).

Por otro lado, algunas consideraciones prácticas previenen el uso de canales demasiado angostos ó reactores fuertemente empacados dado que por ejemplo: la resistencia al flujo aumentará y no se podrán usar impulsores de baja presión como bombas peristálticas, buretas a pistón, etc., el sistema se bloqueará con facilidad por partículas sólidas, etc..

El nivel óptimo de diámetro de tubos utilizado en FIA es de 0.5 mm, aunque el de 0.75 mm es muy útil para la construcción de sistemas con dispersiones mayores. El diámetro de 0.75 mm es el que se ha seleccionado en los trabajos que presentamos en este estudio.

A través de las ecuaciones que establecen la influencia de la velocidad de flujo de solución de transporte y la longitud (ó volumen del reactor) sobre la dispersión y el tiempo de residencia, se pueden diseñar distintos sistemas de flujo.

Por ejemplo, cuando se diseñan sistemas de dispersión media donde la muestra tiene que reaccionar con los componentes del carrier<sup>141,142</sup>, en primer lugar uno debería tender a aumentar la longitud del reactor de modo de aumentar el tiempo de residencia. Concordantemente la dispersión de la zona de muestra se incrementará con la distancia recorrida, lo que se traducirá en una banda mas ancha y en una pérdida en sensibilidad y en frecuencia de muestreo tal como se puede ver en la Figura 5.4 derecha.

Cuando es necesario que la muestra interactúe con un reactivo, se suele aumentar la distancia recorrida aunque esto implique que la dispersión aumente y la altura de pico FIA se haga cada vez mas chica. El incremento en el tiempo de residencia que se obtiene a través del aumento de la longitud del reactor no vale la pena por encima de un cierto límite. En lugar de aumentar L, se puede disminuir la velocidad de bombeo Q y mantener L tan corto como sea práctico. Debido a las distancias físicas entre los componentes individuales de un sistema FIA, se debe llegar a una situación de compromiso y de allí que en la práctica, la distancia total de un buen diseño FIA es de entre 10 y 100 cm, con tubería de 0.5 mm y la



velocidad de bombeo se condiciona a tiempos de residencia del orden de los 20 segundos a 30 segundos.

Como conclusión se puede decir que la dispersión de la zona de muestra se aumenta con la distancia recorrida por la muestra a través del conducto tubular y decrece a medida que decrece la velocidad de flujo. De esta manera si se quiere reducir la dispersión y aumentar el tiempo de residencia para que los reactantes puedan interactuar (en especial para aquellas reacciones de cinética lenta), las dimensiones del tubo tienen que ser minimizadas y la velocidad de bombeo disminuída.

Esto último no parece ser muy intuitivo, dado que se tendería a pensar que un aumento en la velocidad lineal de flujo (que está relacionada con  $Q$ ) debería conducir a un flujo turbulento en el reactor tubular con consecuente disminución de la dispersión. Para los sistemas FIA, se contradicen los principios establecidos por la ingeniería de reactores químicos debido a que se utilizan tubos muy angostos que, sumados a velocidades de carrier bajas, conducen a un flujo laminar dentro del reactor con un perfil parabólico de velocidades. Un aumento de la velocidad lineal de flujo hace mas pronunciado el gradiente de concentraciones en la dirección axial y aumenta la dispersión como queda demostrado en la bibliografía.<sup>143-145</sup>.

### **5.3.3. Influencia de la geometría del reactor.**

El tubo helicoidal es la forma geométrica mas frecuente de los microreactores FIA si bien se han usado otros como el tubo recto, la cámara de mezcla, el rector en mallas ó bien combinaciones de estas geometrías.

El tubo recto presenta una situación simple: a mayor  $L$  se obtienen valores mayores de  $t$ ,  $t_b$  y de coeficiente de dispersión como viéramos en la sección anterior.

Cuando se usa un reactor helicoidal (los mas frecuentemente utilizados en sistemas FIA) la fuerza centrífuga que se origina por la circulación del fluido a través del tubo, se traduce en flujo de tipo radial<sup>140</sup>. Cuando la velocidad de flujo es baja, la fuerza centrífuga no es muy grande y el perfil de velocidades es parabólico. A velocidades de flujo muy altas, el perfil es diferente dado que las moléculas de la pared del tubo viajan a una velocidad mayor que las del centro. Esta situación produce una circulación dividida, simétrica con respecto al plano central ideal del tubo. Esta circulación, denominada "flujo secundario" por Tijssen<sup>146</sup> tiene el mismo efecto que la difusión radial y provoca una disminución en la dispersión de la muestra inyectada.

#### **5.4. Distintas configuraciones FIA**

Las distintas configuraciones FIA desarrolladas hasta la actualidad pueden observarse en la Figura 5.6. Sus alcances y limitaciones están muy bien descriptas en el libro de Ruzicka<sup>131</sup> ó el de Valcarcel<sup>140</sup>.

Podemos dividirlos mas groseramente en: a) sistemas de una línea y b) sistemas en multilínea, en particular los que involucran confluencia de dos corrientes.

##### **a) Sistemas en una línea.**

En los sistemas de una línea (ya descriptos), la corriente de carrier contiene un reactivo ( $C^0_R$ ) dentro del cual se inyecta la muestra ( $C^0_S$ ) de modo que ambos conducen a concentraciones  $C_R$  y  $C_S$  que se obtienen por dispersión mutua de la zona de muestra y la corriente de carrier tal como lo observará el detector. A un

dado tiempo "t" transcurrido entre el punto de inyección y la observación para la muestra S y para el reactivo R, se obtendrán valores de  $D_S$  y  $D_R$  respectivamente. Es obvio que cuando la concentración de la muestra es alta, la del reactivo es baja ó, lo que es lo mismo, a medida que  $D_S$  tiende a 1,  $D_R$  tiende a cero. Consecuentemente, la especie a ser medida no podrá formarse en el centro de la zona de muestra, donde  $D_S = 1$  porque, en ausencia de reactivo aparece un pico desdoblado<sup>147,148</sup> tal como explicáramos en la sección 5.3.1 y la altura de pico  $C_S^{\max}$  no conducirá a una curva de calibrado lineal. En otras palabras, hay que mantener un exceso de reactivo para mantener la linealidad, lo que no es bueno cuando se trata de incrementar la sensibilidad en un método FIA. Para concluir, los gradientes de concentración de muestra y reactivo son imágenes especulares y si el valor de  $D_S$  se aproxima a 1, existirá un defecto de reactivo en el centro de la zona de muestra. Las configuraciones de doble línea<sup>149-151</sup> han sido diseñadas con el objeto de eliminar el desdoblamiento del pico de muestra.

#### **b) Sistemas con dos ó mas líneas**

La "confluencia" de dos ó mas corrientes se usa en FIA cuando existe necesidad de incorporar reactivos adicionales. Se utilizan dos ó mas canales, uno de ellos lleva a la solución de transporte y el otro u otros transportan diferentes reactivos hasta el punto donde la corriente se mezcla con la zona de muestra. El patrón de mezcla en el punto donde las corrientes confluyen debe ser muy bien estudiado. La Figura 5.7 muestra la configuración de un sistema de dos líneas y las señales resultantes.

La dispersión de muestra y reactivo en un sistema de dos líneas difiere del de una en que: i) el coeficiente de dispersión  $D_S$  de la muestra no puede alcanzar nunca el valor de 1; ii) la dispersión del reactivo no se ve influenciada por la

dispersión de la zona de muestra dado que el reactivo se agrega a todos los elementos de la zona de muestra dispersada en la misma cantidad.

Esto último puede ser mejor entendido a través de la Figura donde se muestra el perfil de concentraciones del reactivo ( $C^0_R$ ) bombeado a una velocidad de flujo de  $y$  ml/min y el de la muestra ( $C^0_S$ ) inyectada en la corriente transportadora del solvente (agua) que está siendo bombeada a  $x$  ml/min. Las concentraciones  $C_S$  y  $C_R$  observadas cuando ambas pasan el detector muestran que  $D_R$  permanece constante en toda la escala de tiempos barrida y  $D_S$  varía conforme se dispersa la zona de muestra.

De esta manera, comparado con un sistema de una línea es más fácil mantener un exceso de reactivo a lo largo de toda la zona de muestra con estos sistemas aunque  $D_S$  se encuentre cercano al estado estacionario.

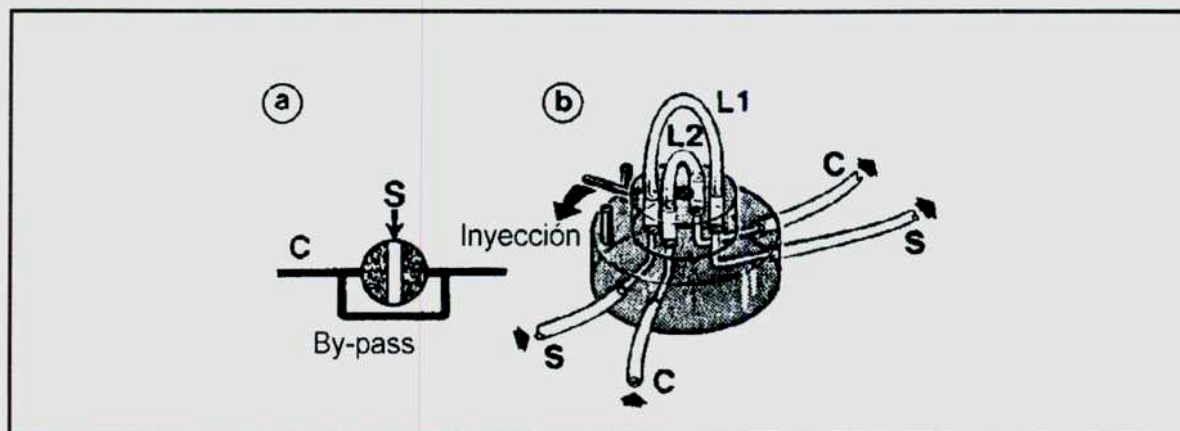
Las consideraciones precedentes pueden aplicarse a varias configuraciones FIA, incluso multilínea, para calibraciones sencillas como la técnica de la adición estándar y/o para las mas recientes aplicaciones prácticas<sup>152-155</sup>.

La presencia de un punto de confluencia genera de todas formas algunos problemas: a) la presencia de picos espúreos en el proceso de mezcla de soluciones de distinto índice de refracción y b) el aumento de la dispersión de la zona de muestra como consecuencia de que una vez producida la mezcla, el flujo resultante es mayor que el de partida.

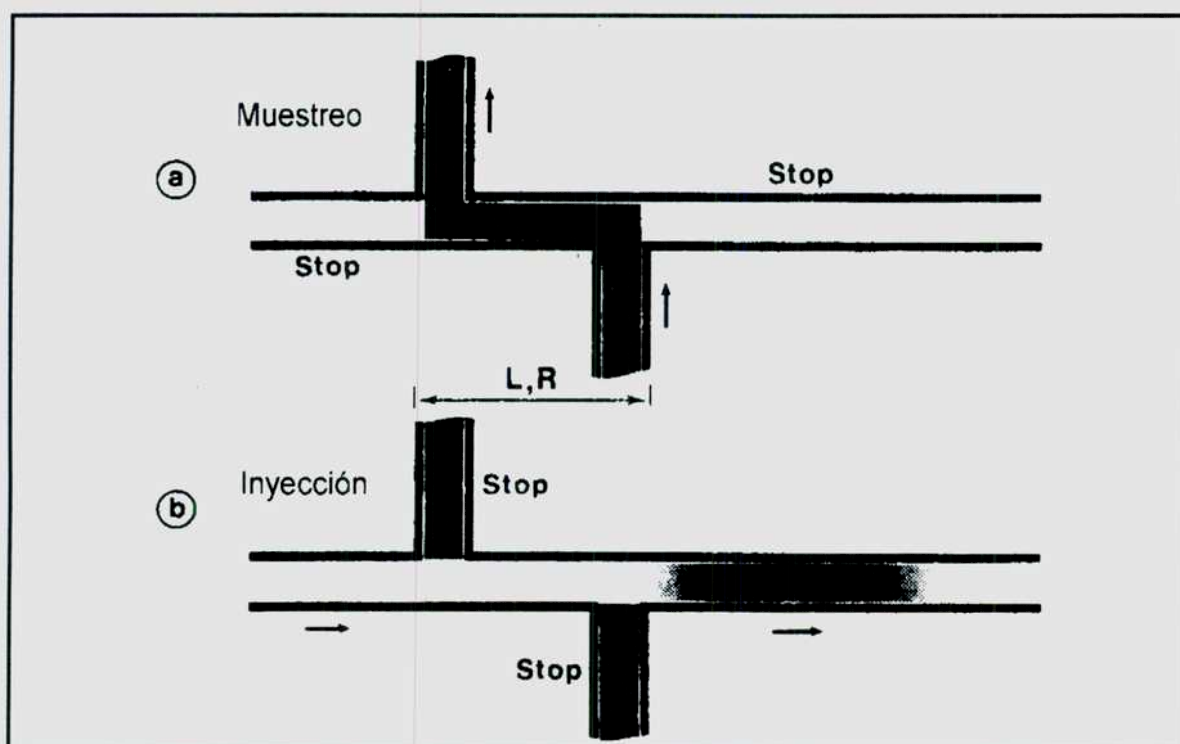
Estos inconvenientes llevan a que las últimas trabajos en FIA tiendan a los retornar a sistemas monolínea como la mejor alternativa para controlar la dispersión o bien, al uso de soluciones mezcla compatibles (por ejemplo una solución de transporte en HCl 1 M es compatible con un reactivo disuelto en HCl 1M) para eliminar señales de fondo no deseadas por diferencias en índice de refracción.

A modo de conclusión, podemos decir que las configuraciones FLA presentan versatilidad para el trabajo analítico sin sacrificar en gran medida los parámetros de calidad que deben caracterizarlo. En este estudio presentaremos sistemas automáticos novedosos que igualan ó mejoran cualquiera de las técnicas convencionales de estado estacionario.

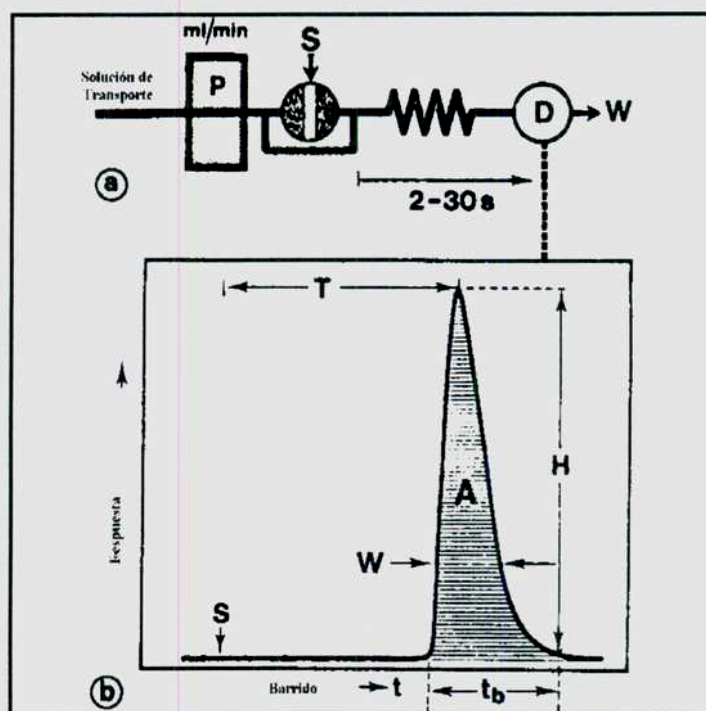
**Figura 5.1**  
**Esquema de una válvula de inyección rotatoria para sistemas FIA**



**Figura 5.2**  
**Principio de funcionamiento de la inyección hidrodinámica**



**Figura 5.3**  
Sistema en línea única y señal FIA característica



**Figura 5.4**  
Dispersión en un sistema en flujo

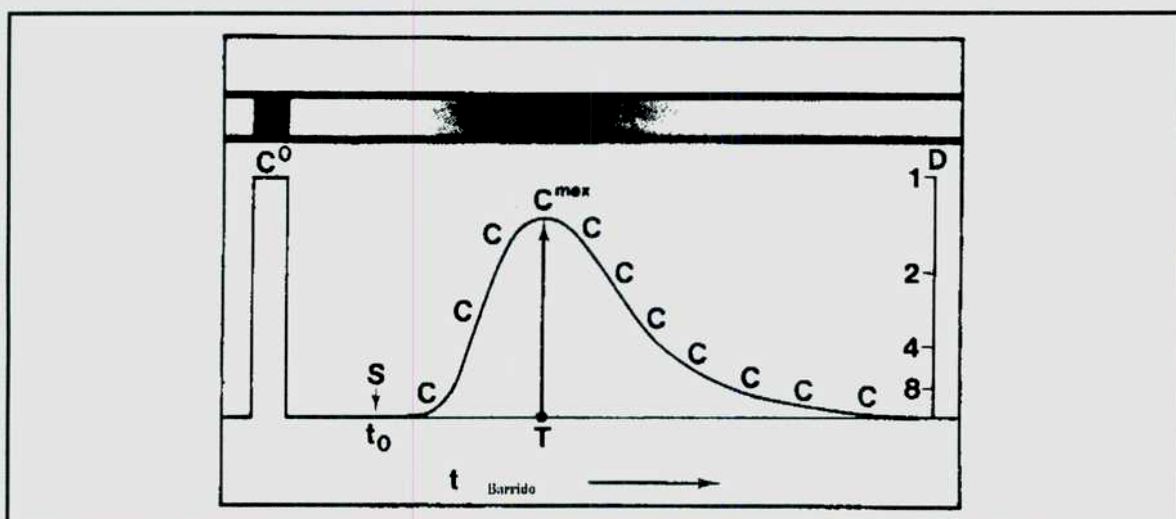


Figura 5.5

a) Influencia del volumen de muestra inyectado en la señal transiente de un sistema FIA (izquierda)

b) Dispersión de la zona de muestra inyectada en función de la longitud del tubo

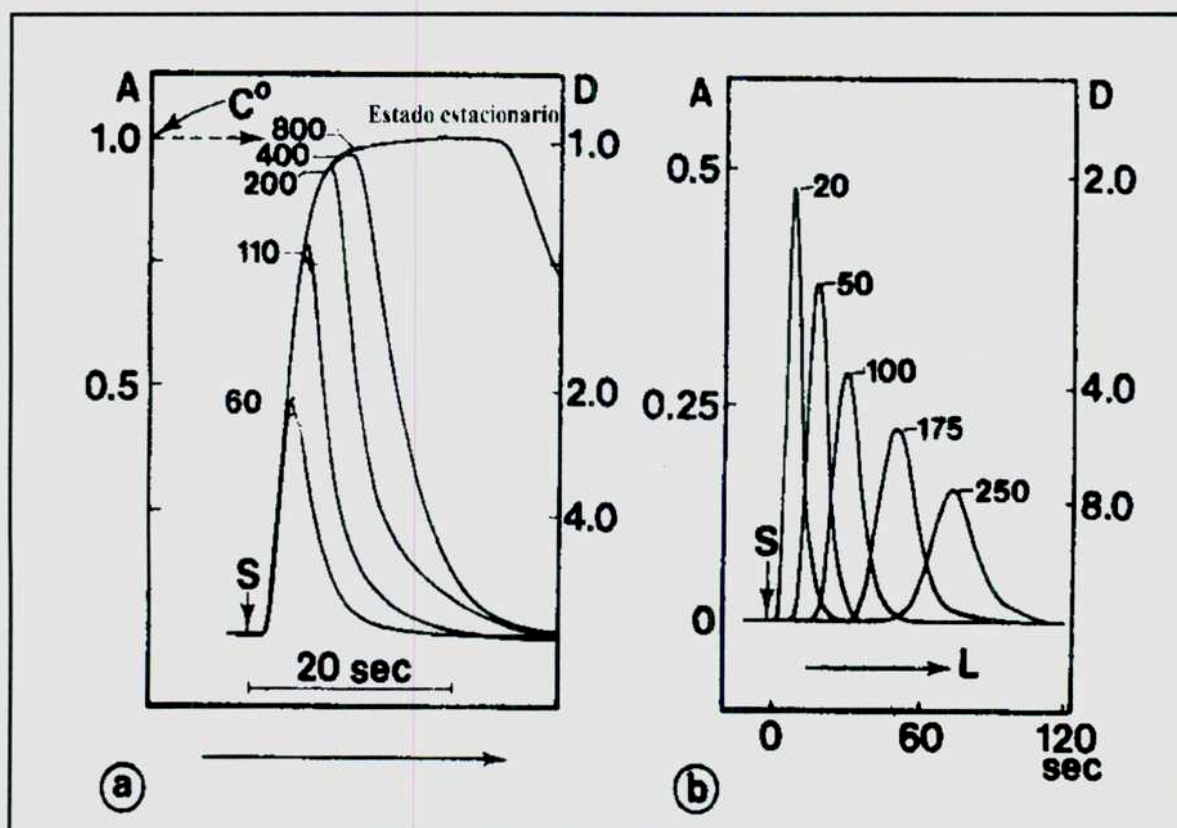
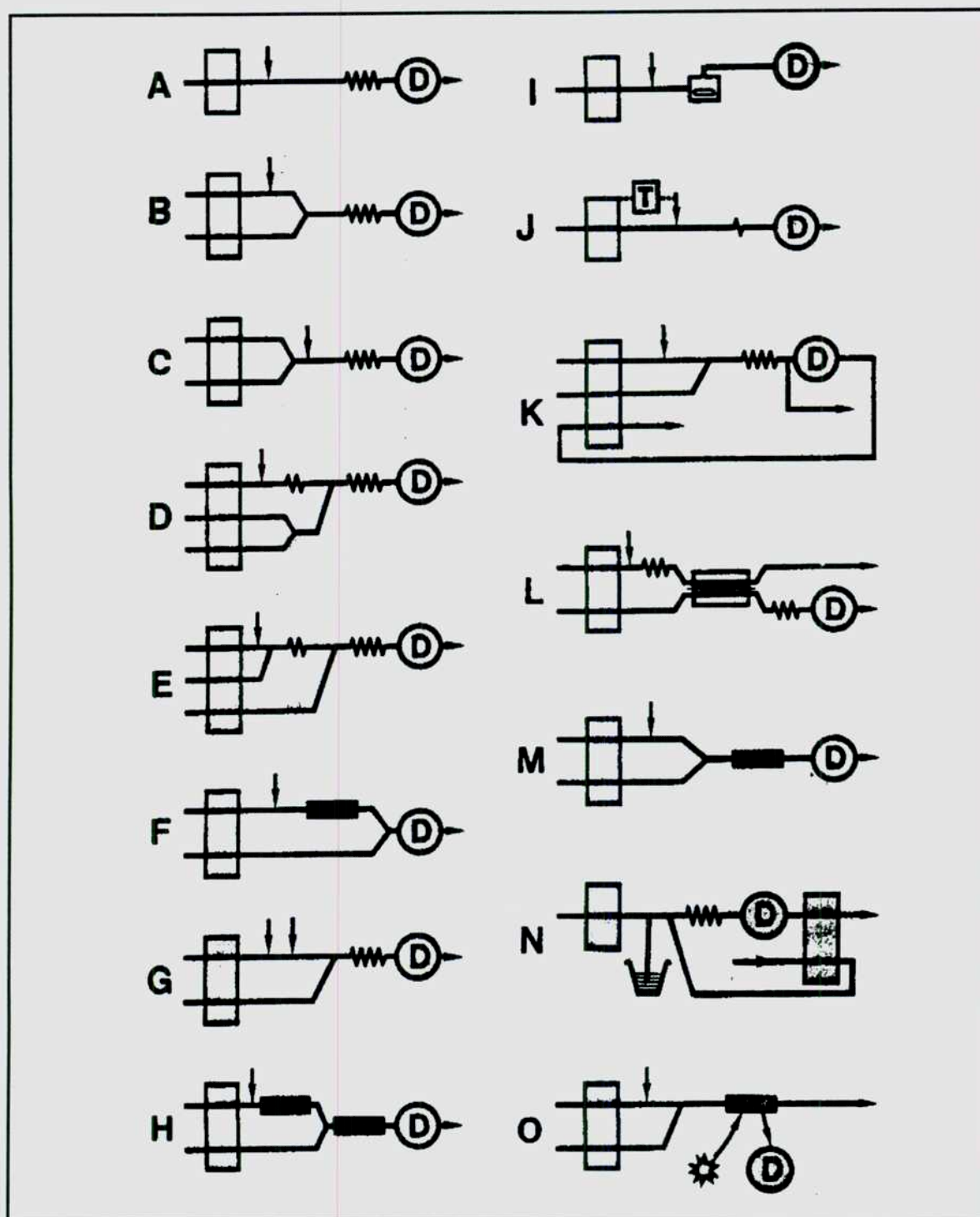




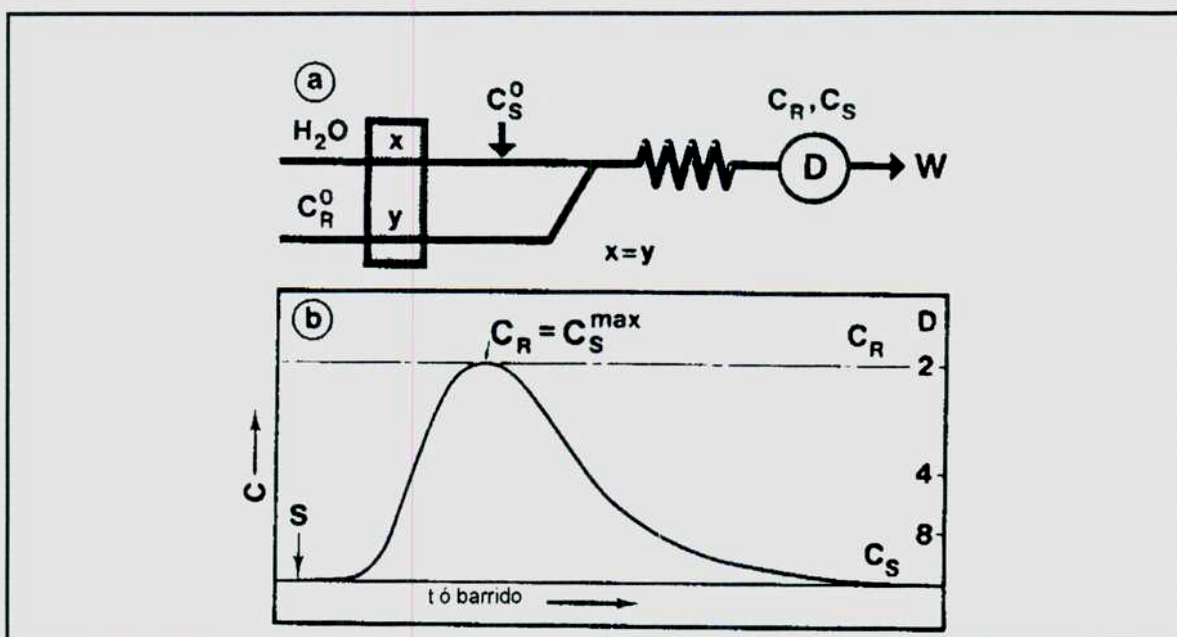
Figura 5.6

Diagramas de distintas configuraciones de sistemas de análisis por inyección en flujo



A: línea única, B: dos líneas y una sola confluencia; C: premezcla de reactivo en una sola línea;  
 D: Dos líneas con una sola confluencia y premezcla de reactivos; E: tres líneas y dos confluencias;  
 F: reactor empacado en línea; G: doble inyección y una confluencia; H: reactores secuenciales;  
 I: Línea única con cámara de mezcla; J: línea única y flujo detenido; K: extracción por solventes;  
 L: diálisis; M: dos líneas, una confluencia; N: inyección hidrodinámica; O: dos líneas, una confluencia,  
 optosensor sobre sup.sólida.

Figura 5.7



Perfiles de dispersión mutua de muestra (S) y reactivo (R) en un sistema de dos líneas. a) Sistema de dos líneas donde la muestra de concentración original  $C_S^0$  se inyecta en una solución de transporte que se mezcla con una corriente de reactivo de concentración original  $C_R^0$  con velocidades de bombeo de ambas, iguales ( $x=y$ ). El detector sensa la zona de muestra dispersada, la que se dispersa primero en la corriente de carrier inerte y luego en la de reactivo. En el detector la concentración de muestra y reactivo son  $C_S$  y  $C_R$  (de no existir reacción química). b) Mientras que la zona de muestra dispersada produce un gradiente de concentración  $C_S$ , la concentración del reactivo permanece constante a lo largo del barrido y  $DR=2$

# **CAPITULO 6**

## Capítulo 6

### PARTE EXPERIMENTAL

#### 6.1. Aparatos y Reactivos

##### a) Reactivos:

La nómina de los reactivos y sus características se pueden leer en el apéndice correspondiente al presente capítulo.

##### b) Aparatos:

Ver listado y características en el apéndice.

#### 6.2. Procedimiento

##### 6.2.1. Colección y Preservación de Muestras

##### a) Aguas:

Se colectaron muestras de agua superficial de río (cuya localización indicaremos en el capítulo de aplicaciones) conteniendo cantidades apreciables de material suspendido. La colección de muestras se realizó por inmersión de botellas plásticas de polipropileno de baja densidad diseñadas para el muestreo de aguas en las condiciones descritas por Jouden para el muestreo de líquidos heterógeneos en movimiento<sup>156</sup>. La preservación de la solución sobrenadante, después de separar en campo a través de filtros de 0.45  $\mu$ , se realizó conforme señala EPA<sup>14</sup> para la preservación de cada uno de los **metales en solución** que se han estudiado. Los análisis se realizaron teniendo en cuenta el tiempo máximo de preservación (MHT) tabulado en cada caso.

Se colectaron también muestras sin filtrar que se acondicionaron y preservaron según EPA<sup>14</sup> para la determinación de **metales totales**. Sobre estas muestras se realizó digestión total conforme describiremos más abajo.

Alícuotas de muestras filtradas sin preservar se helaron a 4°C y se remitieron **inmediatamente** al laboratorio para proceder al análisis de concomitantes.

b) Sólidos suspendidos

Los sólidos suspendidos obtenidos como resultado de la filtración, se secaron a 60°C en el laboratorio, se envasaron en bolsas de polietileno y se mantuvieron en heladera hasta el momento de su valoración. Sobre estas muestras se realizó la cuantificación de **metales en el particulado** teniendo en cuenta el MHT señalado en cada caso.

c) Sedimentos

Los sedimentos de fondo fueron obtenidos utilizando un sacabocados de plexiglass de 4.5 cm de diámetro, secados a 60°C y preservados según EPA<sup>14</sup>.

d) Plantas

Ejemplares maduros de plantas predominantes en el lugar, macrofitas emergentes, fueron muestreadas en algunos puntos, secadas a 60°C y molidas finamente para realizar análisis de metales pesados totales.

### **6.2.2. Mineralización de sólidos.**

a) Sedimentos y sólidos suspendidos

Se utilizó un sistema de digestión abierto calefaccionado por microondas con un programa de trabajo diseñado en nuestro laboratorio que aparece en la Tabla 6.1. El programa involucra la disolución completa de 0.500 g de muestra de sedimentos y/o sólidos suspendidos en un volumen final de 50 ml y utiliza un recipiente de teflón para todo el proceso de mineralización.

**Tabla 6.1:** Mineralización total de sedimentos y sólidos suspendidos

Paso	1	2	3	4	5	6
Reactivos	HNO <sub>3</sub>	HCl	HF	-----	HCl	H <sub>2</sub> O
Volumen	6 ml	5 ml	15 ml	-----	3 ml	40 ml
Velocidad	3 ml/min	3 ml/min	1 ml/min		5 ml/min	5 ml/min
Potencia*	10%	20%	20%	85%	15%	35%
Tiempo(**)	5 min	5 min	10 min	20 min	10 min	10 min
Condición	Reflujo	Reflujo	Reflujo	Reflujo	Reflujo	Reflujo

(\*) % respecto de la máxima potencia alcanzable por el equipo según se describió en el capítulo 2.  
(\*\*) Tiempo real de calentamiento, no incluye el tiempo de agregado de reactivos.

b) Digestión de suspensiones para el análisis de metales totales

Otra alternativa para la valoración de metales totales en las muestras heterógenas, es trabajar sobre la suspensión previamente sometida a ultrasonido. Si bien, este procedimiento es incompleto dado que los metales son extraídos sin disolución total de la muestra (la sílice permanece precipitada), nos interesó estudiarlo para comparar con los resultados obtenidos a través de la suma de concentración en agua filtrada y en sólidos suspendidos.

La experiencia se realiza sobre 50,0 ml de muestra previamente homogeneizada que se digiere a través de cuatro etapas, llevándose el digerido, previa separación por filtración del insoluble, a 50,0 ml finales. Las etapas del programa se muestran en la Tabla 6.2.



**Tabla 6.2.** Mineralización parcial de soluciones heterogéneas para el análisis de metales totales.

<b>Etap</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Reactivo</b>	HCl	HNO <sub>3</sub>		
<b>Volumen</b>	3 ml	1 ml	-----	-----
<b>Velocidad</b>	5 ml/min	5 ml/min		
<b>Potencia</b>	-----	-----	40%	20%
<b>Tiempo</b>	-----	-----	8 min	20 min
<b>Condición</b>	-----	-----	Reflujo	Reflujo

c) Solubilización de las distintas partes de las plantas muestreadas.

Se ensayaron distintos programas de digestión para los ejemplares de plantas estudiados. Los mejores resultados se obtuvieron con los dos que se presentan en las Tablas 6.3 y 6.4 respectivamente. Los sistemas de digestión utilizados en cada programa son distintos por lo que los compararemos críticamente.

En el sistema de digestión abierto (Maxidigest 301) hemos utilizado 1 g. de muestra disuelta en un volumen total de 50 ml. La mineralización se realiza en un recipiente de cuarzo con ácido nítrico y agua oxigenada como reactivos.

Para el sistema de digestión cerrado (Prolabo Superdigest), hemos trabajado sobre 0,5 gramos de muestra en de 10 ml finales. La destrucción de la materia orgánica se realiza en recipiente de cuarzo con 6 ml ácido nítrico como único reactivo.

**Tabla 6.3.** Mineralización de plantas con sistema abierto Maxidigest 301

Paso	1	2	3	4	5	6
Reactivos	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HNO <sub>3</sub>	HNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HNO <sub>3</sub>	HNO <sub>3</sub>
Volumen	1 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Velocidad(*)	0,5ml/min	5 ml/min	5 ml/min	5 ml/min	5 ml/min	5ml/min
Potencia	30%	40%	40%	30%	40%	40%
Tiempo(**)	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	1 min
Condición	Reflujo	Reflujo	Reflujo	Reflujo	Reflujo	Reflujo

(\*) El primer agregado de agua oxigenada debe realizarse siempre a velocidad mínima para evitar que el líquido "trepe"

(\*\*) Es solamente tiempo efectivo de calentamiento.

**Tabla 6.4.** Mineralización de plantas con sistema de microondas cerrado**Superdigest**

Paso	1	2	3
Potencia	30%	99%	85%
Tiempo	4 min	4 min	6 min
Enfriamiento (*)	Activo	Activo	Inactivo

(\*) El sistema de enfriamiento permanece activo ó no después de completado cada paso.

**6.2.2.1. Discusión de los resultados**

Cuando se requiere evaluar la aptitud de los diferentes métodos de digestión asistidos por microondas en distintas matrices sólidas y decidir sobre el más adecuado, el analista busca<sup>157,158</sup>:

- a) Máxima recuperación del analito.
- b) Uso de un número reducido de reactivos y mínima cantidad de cada uno de ellos a fin de evitar la contaminación y el efecto de la matriz (de acuerdo al



procedimiento de valoración a seguir). Además, en caso de ser posible, se seleccionarán aquellos que puedan obtenerse puros sin dificultad y con un costo mínimo<sup>159</sup>.

c) Procesos de digestión cortos que permitan aumentar la frecuencia de mineralización (cantidad de muestras digeridas por hora) utilizando programas de mínima complejidad.

d) El menor factor de dilución cuando se deba realizar análisis de vestigios. La cantidad de muestra se seleccionará de acuerdo con el compromiso resultante entre evitar el sobrecalentamiento en la superficie de materiales que muestran poca penetración (ver capítulo 2) y alcanzar el mínimo factor de dilución que permita más libertad en la selección de la técnica de valoración.

En el presente trabajo se han desarrollado los programas de digestión tratando de utilizar estos conceptos. Hemos seleccionado sistemas abiertos para la solubilización total de sedimentos y sólidos suspendidos dado que el alto contenido de sílice y la consecuente producción y evolución de  $\text{SiF}_4$  nos impidió el uso de digestores cerrados. En este último caso, el sistema sensor de presión ordenaba discontinuar con el calentamiento toda vez que la presión interna superaba el límite de seguridad.

La mineralización parcial de soluciones heteróneas ( ver Tabla 6.2.) con el objeto de extraer y analizar los metales totales nos condujo a excelentes resultados comparados con la suma proveniente del cálculo de concentraciones de metales en solución y en sólidos suspendidos (ensayo F, nivel de confianza 95%), por lo que fue aplicada en los estudios del Río de la Plata por utilizar menos reactivos y consumir menor tiempo.

Para la digestión de plantas hemos ensayado varios programas de los cuales presentamos dos. (ver Tablas 6.3 y 6.4). Con cualquiera de ellos hemos obtenido excelentes resultados en el análisis de materiales de referencia certificados (National Bureau of Standards, Citrus leaves SRM 1572) por lo que no utilizamos la recuperación del analito como criterio de selección. Sin embargo, el sistema cerrado permite trabajar en tiempos más cortos y emplear una mínima cantidad de ácido nítrico como único reactivo además de disminuir el factor de dilución por lo que fue elegido para el ataque de las distintas partes de la plantas emergentes analizadas.

De los estudios realizados en ocasión del presente trabajo, hemos llegado a la conclusión que la discusión planteada: ¿cuál es el mejor sistema, abierto ó cerrado?<sup>160</sup> no tiene sentido en términos absolutos dado que depende del analito, su concentración y de las peculiaridades de cada material. De allí que se pueda seleccionar criteriosamente la digestión abierta ó cerrada combinada con recipientes de teflón ó vidrio, diferentes mezclas ácidas, distintos tiempos de ataque y potencia de microondas para desarrollar los procedimientos de disolución adecuados para cada problema analítico. O sea que, a nuestro criterio, los digestores abiertos y cerrados no "compiten" entre sí sino que por el contrario se "complementan" lográndose, a través de una decisión inteligente, la disolución completa de prácticamente cualquier material para el análisis de cualquier compuesto inorgánico.

### **6.2.3. Análisis de vestigios metálicos**

#### **6.2.3.1. Cromo Total**

La determinación de **cromo total** se realizó sobre aguas filtradas, sedimentos, sólidos suspendidos y plantas. Excepto en el caso de aguas, las valoraciones en el resto de las muestras se realizaron por absorción atómica con llama de aire/acetileno

según métodos estándares EPA<sup>14</sup>. La validación del método analítico en plantas se realizó por el estándar de referencia certificado NBS SRM 1572.

Teniendo en cuenta las bajas concentraciones, el análisis de cromo total en aguas filtradas fue realizado por absorción atómica con horno de grafito en las condiciones instrumentales desarrolladas en nuestro laboratorio y que se muestran en la Tabla 6.5. Los alcances y limitaciones de la técnica se discutirán seguidamente.

**Tabla 6.5.** Condiciones y perfomance del análisis de cromo total en aguas.

<b>Equipo Shimadzu AA 6501</b> Lámpara de cátodo hueco: cromo Corriente: 10 mA $\lambda$ : 357,9 nm Ancho de ranura: 0,5 nm Corrección de fondo: Deuterio
<b>Parámetros de medición</b> Modo de conversión a concentración: Curva de calibración Orden de la curva de calibración: Primer orden. Procesamiento de señal: altura de pico Volumen de muestra inyectado: 20 $\mu$ l. Unidad de concentración: ng/ml (ppb) Número de estándares: 5

**Condiciones de repetitividad**

	Nº. de replicados	Máx.Nº.de replicados	Coef. de variación límite (CV%)
<b>Medición blanco</b>	2	5	10
<b>Estándares (Adición estándar)</b>	2	5	10
<b>Muestra (adición estándar simple)</b>	2	5	10

Tabla 6.5 (Continuación)

## Programa de horno

Paso#	1	2	3	4	5
Temp.(oC)	80	120	500	500	2400
Tiempo (seg)	10	20	20	20	2
Argón (l/min)	1.0	1.0	1.0	1.0	No
Modo	Rampa	Rampa	Rampa	"Step"	"Step"
Prepico (seg) *	-----	-----	-----	-----	2

# Pasos 1 y 2:secado ó "dry"; 3 y 4: calcinación ó "ash"; 5: atomización.

\* El detector deja de estar "ciego". La señal se registra e integra 2 seg antes del paso 5, esto es a los 18 seg. de comenzado el segundo paso de "ash".

## Performance analítica

**Curva de calibración:**  $Abs = K_1 \cdot [C] + K_0$ ;  $K_0 = 0,0000$ ,  $K_1 = 0,0277$ .

**Sensibilidad** = 0,16 ng/ml ( $A = 0,0044$ )

**Masa característica** ( $m_0$ ) = 3,2 pg

**Ambito de linealidad** = hasta 20 ng/ml

**CV(%)** = 4,9

**Factor de recuperación** (vs.SRLS 2 del NRCC) = 92,3 %

**Límite de cuantificación** = 5,0 ng/ml

**Frecuencia de muestreo** = 20 h<sup>-1</sup>.

## Discusión de los resultados

La determinación de cualquier metal de manera "directa" en aguas naturales se ve enfrentada a una serie de inconvenientes, de los cuales los más graves son: el "empobrecimiento" de la sensibilidad, y la desmejora del límite de detección como consecuencia del efecto de la matriz<sup>161</sup>.

Debido a estas limitaciones, se utilizan técnicas de preparación de la muestra con el objeto de preconcentrar el vestigio y separarlo de la matriz, tal como veremos más adelante aplicadas a la determinación de plomo en un sistema de preconcentración "en línea".

Las técnicas que se utilizan normalmente para este propósito, todas ellas tediosas y largas son: la coprecipitación y co-cristalización<sup>162</sup>; la quelación y extracción por solventes que involucra la formación de un complejo organometálico con pirrolidin ditiocarbamato de amonio (APDC) y posterior extracción del mismo con metil-isobutil-cetona (MIBK) <sup>163</sup>; la preconcentración electrolítica<sup>164,165</sup> ; la quelación "en batch" con resinas tipo Chelex 100 utilizada por primera vez por Riley<sup>166</sup>; etc..

En este estudio hemos logrado la determinación directa de cromo en el agua de río con óptima performance, utilizando como recurso la corrección simultánea del fondo provocado por absorción inespecífica y una selección escrupulosa del pretratamiento térmico de la muestra después de "sembrarla" en el atomizador (horno de grafito). Nótese que en la determinación del cromo, ciertos requisitos fundamentales para la atomización en horno de los que hablamos en el capítulo 4, resultan innecesarios debido a su elevada temperatura de atomización (2400°C). Esta es la causa por la cual se pudo realizar su cuantificación directa sin apelar a modificadores, ya que la covolatilización de sales junto con el analito es irrelevante. Este hecho nos permitió utilizar una temperatura de calcinación (ash) de 500°C sin pérdidas de cromo, el cual se recuperó en un 92.3% en el período de atomización sin empobrecimiento de la sensibilidad. En la etapa de atomización (atomize) se procedió a interrumpir el flujo de argón con el objeto de aumentar el número de átomos en el camino óptimo e incrementar la señal.

### 6.2.3.2. Cromo hexavalente.

El cromo se encuentra en general en los medios naturales en los estados de oxidación III y VI. El cromo (VI) es un tóxico, mientras que el cromo (III) se considera un elemento traza esencial lo que determina que, en general, las concentraciones máximas permitidas del primero en muestras ambientales sean bastante más bajas que la del segundo<sup>167</sup>. Además, naturalmente, el Cr(VI) tiende a reducirse a Cr(III) en el ambiente lo cual disminuye su concentración en medios acuáticos.

Se han realizado muchos esfuerzos con el objetivo de valorar cromo (VI) en el rango de las ppb con mínimo pretratamiento y alta frecuencia de muestreo teniendo en cuenta que es muy fácil la contaminación externa como resultado del manipuleo<sup>6</sup>. En los últimos años se han usado con frecuencia las técnicas de análisis por inyección en flujo acopladas a distintos detectores, desde espectrómetros de absorción y emisión atómica<sup>7,168</sup>, hasta los menos costosos absorciómetros UV-visible<sup>169-172</sup> para obtener una performance analítica óptima para las determinaciones de cromo (VI).

En FIA con detección espectrofotométrica la reacción más utilizada es la de Cr(VI) con 1,5-difenilcarbácida<sup>173-175</sup> y en base a ella, se han hecho muchos intentos para reducir la dispersión química (de la que hablamos en el capítulo 5) y mejorar en consecuencia, la sensibilidad y el límite de detección<sup>171,176</sup>.

En este trabajo, hemos desarrollado un método con detección espectrofotométrica para el análisis del Cr(VI) en el que se utiliza difenilcarbácida (DPC) sólida que se disuelve en flujo en una corriente de HNO<sub>3</sub> 0,8 M.

El uso de la disolución en flujo de la DPC sólida permite el empleo de un sistema FIA de línea única (con su facilidad y simplicidad de operación) y obtener un coeficiente de dispersión (ver capítulo 5)  $D=1.020$  comparado con el procedimiento del estado estacionario. Hemos conseguido de esta manera, parámetros de mérito para esta valoración no informados hasta el momento en la bibliografía.

Se presenta a continuación el procedimiento de valoración en aguas superficiales filtradas<sup>1</sup> así como la discusión de los resultados obtenidos.

### **Procedimiento:**

En la Figura 6.1 se puede observar el sistema en flujo en línea única que se utilizara para realizar las experiencias y que consta de un inyector-conmutador de acrílico como el que se indica al comienzo del capítulo. El microrreactor (ver Figura 6.2) es una columna de teflón (5,0 cm de longitud y 2,0 mm de diámetro interno) empacada con una mezcla de DPC/sílice. La distancia óptima encontrada entre detector y el inyector es de 20 cm. lo que corresponde a un volumen muerto de 0.20 ml. Se utilizó una solución de  $\text{HNO}_3$  0.8 M preparado por dilución adecuada de  $\text{HNO}_3$  (c) como solución de transporte, a una velocidad de flujo de 4 ml/min. (ver apéndice). La tubería es de polietileno (diámetro interno=0.75 mm) y los volúmenes de muestra inyectados de 0.300 ml (longitud de loop=100 cm).

La reacción colorimétrica fue “monitoreada” en 540 nm con un espectrofotómetro UV-visible (ver apéndice) equipado con una celda de flujo de 80  $\mu\text{l}$  de capacidad y 1.00 cm de paso óptico. El procedimiento de inyección es el común para los sistemas de línea única (ver capítulo 5).

---

<sup>1</sup>No se realizó el análisis sobre suelos y sedimentos dado que todo el cromo aparece como Cr(III) tal como veremos luego.



La valoración de las muestras de agua superficial filtrada fue realizada a través de curva de calibración obtenida preparando estándares en el ámbito de concentraciones 0,005-1,00 mg/l de Cr(VI) a partir de Titrisol Merck 1,000 g Cr(VI)/l. Las soluciones al igual que las muestras de agua, se ajustaron con ácido nítrico hasta llevarlas a 0,8 M en el mismo modo de obtener la misma concentración que la de solución de transporte.

La performance obtenida con las condiciones experimentales señaladas más arriba se pueden ver en la Tabla 6.6.

**Tabla 6.6.** Performance analítica para la especiación de Cr(VI) en aguas naturales

**Curva de calibración:**  $Abs = K_1 \cdot [Cr^{+6}] \text{ mg/ml} + K_0$ ;  $K_0 = 0,0001$ ,  $K_1 = 0,490$ ;  $r = 0,9999$

**Sensibilidad** =  $0,49 \text{ (mg/ml)}^{-1}$  (como pendiente de la curva de calibración)

**Ámbito de linealidad** = hasta 0,800 mg/l

**CV(%)** = <1,0

**Factor de recuperación (\*)** = 99,9 %

**Límite de cuantificación** = 0,005 mg/l

**Frecuencia de muestreo** =  $120 \text{ h}^{-1}$ .

(\*) adición estándar a muestras control (sin analito)

Dado que nuestro patrón de referencia no certifica el nivel de  $Cr^{+6}$  se determinó la trazabilidad del método por espectrometría de absorción atómica previa extracción de  $Cr^{+6}$  por formación del complejo organometálico con APDC y extracción en MIBK de acuerdo al método de Wang<sup>177</sup>, aplicando un factor de preconcentración = 5. El método resultó trazable para un nivel de confianza del 95 %. (Test F de Fisher, ver capítulo 3).

### Discusión de los resultados

De acuerdo a lo discutido en el capítulo 5, sabemos que cuando se realiza una valoración a través de un método FIA<sup>131,140</sup>, la frecuencia de análisis es afectada



por el tiempo que transcurre entre la inyección de la muestra y su paso por el detector, mientras que la sensibilidad se ve afectada por la dilución que sufre la muestra en su camino hacia el detector. En nuestro estudio hemos optimizado los parámetros como para obtener los mínimos tiempos de residencia en el sistema de flujo junto con coeficientes de dispersión cercanos a la unidad. Señalaremos a continuación los criterios de selección de cada una de las variables:

a) Sobre la selección de la solución de transporte

Se seleccionó  $\text{HNO}_3$  0.8 M dado que la dependencia de la señal de absorbancia medida (altura de pico) para el complejo Cr-DPC no se modifica cuando la concentración de ácido supera 0.5 M tal como previamente habían demostrado Andrade y colaboradores<sup>176</sup>.

b) Sobre el volumen de muestra

Se seleccionaron volúmenes de muestra de 0.300 ml debido que no se observó aumento en la señal analítica con muestras más grandes. (Ver Figura 6.3). De todas maneras, se debe notar que el uso de la disolución en flujo elimina el desdoblamiento de señal que se obtiene en configuraciones de una sola línea con grandes volúmenes de muestra (ver capítulo 5), alentando el retorno a este tipo de disposición.

c) Sobre la velocidad de flujo de solución de transporte

Como se puede observar en la Figura 6.4, la máxima señal analítica en altura de pico se obtiene para velocidades de solución de transporte entre 3.0 y 4.0 ml/min. Velocidades de flujo menores producen una disminución en la altura de pico mientras que el área permanece constante. Cuando se utilizan velocidades mayores que 4.0 ml/min, la reacción no se completa y la señal disminuye tanto en área como

en altura. Bajo estas condiciones, se pueden realizar por lo menos 120 inyecciones por hora.

d) Sobre las dimensiones y características de la columna.

La columna de teflón (DPC en sílice 25% p/p) se diseñó de manera de disminuir el tiempo de ensamble de la misma en el sistema y los tiempos de limpieza. Las dimensiones óptimas (5 cm de longitud y 2 mm de diámetro interno) fueron seleccionadas para obtener la mejor interacción entre la muestra y la DPC con un mínimo de dispersión a lo que se sumó la necesidad de evitar obstrucciones al flujo de la muestra ó la solución de transporte. (Ver Figura 6.5).

Como el relleno de la columna debía ser "permeable" para permitir el flujo de solución de transporte sin elevar la presión interna del sistema, se adicionó sílice a la DPC para aumentar su porosidad. Se seleccionó una proporción DPC-sílice 25% p/p (ver Figura 6.6) como solución de compromiso que permitió obtener máxima sensibilidad junto con mínimo desarrollo de presión interna y máximo tiempo de vida de la columna. Se pudieron analizar 300 muestras de concentración 0,100 mg/l sin producirse cambios en la señal analítica (desviación estándar relativa del 2 %). Además, cuando la columna se agota y debe ser cambiada, la señal cae abruptamente a cero, evitándose de este modo, cambios en la sensibilidad.

e) Sobre la incorporación de reactores helicoidales

Las experiencias realizadas que involucraron el agregado de reactores al sistema para obtener máximo contacto entre los reactantes no mostraron cambios en la señal analítica y solamente aumentaron los tiempos de residencia y el coeficiente de dispersión. Además, el análisis con flujo detenido (stop flow) no mostró cambios en la señal de absorbancia con el tiempo lo que aseguró un máximo grado de reacción.

Podemos concluir que utilizando un reactivo en fase sólida, hemos obtenido valores de coeficientes de dispersión y sensibilidad no informados antes para un sistema en flujo con detección colorimétrica. De acuerdo con lo que se indica en la bibliografía, las configuraciones en flujo inverso<sup>178</sup>, parecieran tener una mayor sensibilidad que las de línea única debido a que las segundas producen picos desdoblados que empobrecen la sensibilidad cuando se trabaja con volúmenes grandes de muestra (ver capítulo 5), problema que se elimina con el uso de reactivos sólidos.

El sistema que hemos desarrollado para este trabajo permite una sensibilidad óptima para la cuantificación del complejo Cr(VI) -DPC a través de:

- i) la obtención de una mezcla reactivo-analito con exceso suficiente del primero en el máximo del perfil que asegura el máximo grado de reacción:
- ii) la disminución de la dilución de muestra y eliminación del desdoblamiento de pico por inyección de volúmenes grandes (la altura de la señal es directamente proporcional a la concentración sin importar el tamaño de la muestra) y
- iii) la eliminación de la distorsión de la señal cuando se usan grandes concentraciones de reactivos.

Por otro lado, si bien en la bibliografía relacionada con los sistemas en flujo (ver capítulo 5) se recomienda el uso de sistemas multilínea para mejorar el límite de detección<sup>179,180</sup> porque evitan la aparición de picos espúreos por diferencias de índice de refracción entre reactantes (efecto Schlieren), nuestro método elimina estos problemas porque uno de los reactantes es un sólido.

En resumen, se ha obtenido con un sistema en línea única y adición de reactivos sólidos, la mejor performance analítica informada hasta ahora en la

bibliografía relacionado con la detección espectrofotométrica de cromo en un sistema en flujo. Los valores de parámetros de calidad son comparables al del estado estacionario y aún mejores, dado que lo aventajan en frecuencia de análisis. (ver Tabla 6.7).

Además, a través de nuestras experiencias hemos encontrado la evidencia experimental de lo señalado por Tyson<sup>181</sup> en su último trabajo sobre sensibilidad y análisis en flujo: "La regla simple para obtener alta sensibilidad es **maximizar** la concentración del reactivo".

**Tabla 6.7.** Análisis de Cr(VI): Estudio comparativo de performance.

	"Batch" <sup>175</sup>	Fia Convencional <sup>176</sup>	Disolución en flujo
Sensibilidad (u.a.*mg/l)	0.50	0.19	0.49
Límite de cuantificación (mg/l)	0.002	0.015	0.005
Volumen de muestra (ml)	20	0.08	0.3
Samples (h-1) <sup>1</sup>	10	120	120

\*Unidades arbitrarias

**6.2.3.3.Cadmio**

La valoración de cadmio sobre muestras de aguas naturales, sedimentos y/o sólidos suspendidos se realizó por absorción atómica con horno de grafito. La valoración sobre plantas, teniendo en cuenta que el nivel de "background" tabulado para las especies en estudio<sup>6</sup> es alto, se realizó por espectrometría de absorción atómica con llama en las condiciones instrumentales que refiriéramos en un trabajo previo<sup>182</sup>. La determinación sobre aguas naturales filtradas se realizó sin preacondicionamiento de las muestras ni introducción de modificadores de matriz. Las variables instrumentales y performance se muestran en la Tabla 6.8.

La valoración en sedimentos y sólidos suspendidos se realizó con la adición de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0.5% (sin prepirólisis) como modificador de matriz, en una proporción de 10  $\mu\text{l}$  de solución por 30  $\mu\text{l}$  de muestra con lo que se mejoró sensiblemente la performance del método. De todas maneras, tal como se observa en la Tabla 6.9, en la que sólo se muestra la nueva programación del horno y los parámetros de mérito para la valoración, estos últimos no alcanzan la calidad de los de agua filtrada pero optimizan los ya reportados en la bibliografía sobre muestra digeridas sin preconcentrar<sup>157</sup>.

**Tabla 6.8.** Condiciones y performance del análisis de cadmio en aguas.

<p><b>Equipo Shimadzu AA 6501</b>  Lámpara de cátodo hueco: cadmio  Corriente: 6 mA  <math>\lambda</math>: 228,8 nm; ancho de ranura: 0,2 nm  Corrección de fondo: Deuterio</p>
---

<p><b>Parámetros de medición</b>  Modo de conversión a concentración: Curva de calibración  Orden de la curva de calibración: Primer orden  Procesamiento de señal: altura de pico  Volumen de muestra inyectado: 20 <math>\mu\text{l}</math>.  Unidad de concentración: ng/ml (ppb); Número de estándares: 5</p>
---

**Condiciones de repetitividad**

	Nº. de replicados	Máx.Nº.de replicados	Coef. de variación límite (CV%)
<b>Medición blanco</b>	2	3	20
<b>Estándares (Adición estándar)</b>	2	3	20
<b>Muestra (adición estándar simple)</b>	2	3	20



**Tabla 6.8. (Continuación)**  
**Programa de horno**

Paso#	1	2	3	4	5
Temp.(oC)	80	120	500	500	1600
Tiempo (seg)	10	20	20	20	2
Argón (l/min)	1.0	1.0	1.0	1.0	No
Modo	Rampa	Rampa	Rampa	"Step"	"Step"
Prepico (seg) *	-----	-----	-----	-----	2

# Pasos 1 y 2:secado ó "dry"; 3 y 4: calcinación ó "ash"; 5: atomización.

\* El detector deja de estar "ciego". La señal se registra e integra 2 seg antes del paso 5, esto es a los 18 seg. de comenzado el segundo paso de "ash".

**Performance analítica**

**Curva de calibración:**  $Abs = K_1 \cdot [C] + K_0$ ;  $K_0 = 0,0000$ ,  $K_1 = 0,1137$ .

**Sensibilidad** = 0,040 ng/ml ( $A = 0,0044$ )

**Masa característica** (mo) = 0,77 pg

**Ambito de linealidad** = hasta 3,0 ng/ml

**CV(%)** = 5,6

**Factor de recuperación** (vs.SRLS 2 del NRCC) = 96,2 %

**Límite de cuantificación** = 0,2 ng/ml

**Frecuencia de muestreo** = 20 h<sup>-1</sup>.

**Tabla 6.9. Idem 6.8 en en sedimentos y sólidos suspendidos.**

**Programa de horno**

Paso#	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Temp.(°C)	80	80	130	130	500	500	850	850	1600
Tiempo (seg)	5	5	20	25	20	5	10	17	2
Argón (l/min)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	No
Modo	Rampa	"Step"	Rampa	"Step"	Rampa	"Step"	Rampa	"Step"	"Step"
Prepico (seg)*	-----	-----	-----	-----					2

# Pasos 1,2,3,4: secado ó "dry"; 5,6,7,8: calcinación ó "ash"; 9: atomización.

\* El detector deja de estar "ciego". La señal se registra e integra 2 seg antes del paso 9, esto es a los 15 seg. de comenzado el cuarto paso de "ash".

Tabla 6.9 (Continuación)

**Performance analítica****Curva de calibración:**  $Abs = K_1 \cdot [C] + K_0$ ;  $K_0 = 0,0000$ ,  $K_1 = 0,0044$ .**Sensibilidad** = 0,10 ng/ml ( $A = 0,0044$ )**Masa característica** ( $m_0$ ) = 2,0 pg**Ambito de linealidad** = hasta 3,0 ng/ml**Límite de cuantificación** = 0,8 ng/ml; **CV**(%) = 7,6**Frecuencia de muestreo** = 10 h<sup>-1</sup>.**Discusión de los resultados**

La valoración de cadmio por absorción atómica con horno de grafito es complicada en aquellos medios naturales muy ricos en cloruros debido a la elevada volatilidad de los compuestos clorados de cadmio, que se traducen en una muy baja recuperación del analito<sup>183</sup>. En nuestro caso, los niveles de cloruro en las aguas de río no influenciaron fuertemente la señal dado que se pudo trabajar con curva de calibración en agua y la valoración pudo realizarse con buena recuperación (96,2%) a una temperatura de atomización de 1600°C previa eliminación completa de la matriz a 500°C, utilizando una rampa lenta para el aumento de temperatura. Por el contrario, la matriz de muestra que acompaña al cadmio luego de cualquiera de las digestiones sugeridas al comienzo del capítulo es rica en ácido clorhídrico, lo que hace mucho más difícil su valoración por formación de cloruros volátiles.

Tal como viéramos en el capítulo 4, el agregado de modificadores de matriz es una buena manera de correr el pulso de absorbancia en función de tiempo para un analito dado (ver Figura 4.6, capítulo 4) sobre todo cuando no se puede utilizar una plataforma de L'vov y es necesario atomizar desde la pared como en nuestro caso.

El empleo de  $NH_4H_2PO_4$  al 2,5% como modificador de matriz nos ha permitido una muy buena recuperación del analito en la etapa de atomización y ha

evitado la covolatilización de las sales de cadmio en la calcinación ó "ash". De hecho, la temperatura de esta etapa fue elevada a 850°C sin que se evidenciaran pérdidas de cadmio (la recuperación fue probada vs. el estándar de referencia certificado).

Respecto del mecanismo de acción del modificador de matriz no tenemos evidencias experimentales puesto que no constituye el objetivo del estudio, pero podría ocurrir que como el cloruro de cadmio es volátil y difícil de disociar (temperatura de disociación aproximada 600°C), la adición de fosfatos provoque la formación de un compuesto entre el cadmio y el fósforo más estable y menos volátil que permita la elevación de la temperatura de "ash" y la completa eliminación de la matriz con buena recuperación del analito. De ser así, asumiríamos que el escenario de formación del haluro es la fase condensada en el proceso de pirólisis y no la fase gaseosa durante el período de atomización como sostienen algunos autores<sup>184,185</sup>.

De todas maneras debe tenerse en cuenta que, a pesar de haberse podido cuantificar cadmio sin separación previa de concomitantes, se ha sufrido una pérdida considerable de sensibilidad en el método, aumentando el valor de masa característica de 0.77 pg en aguas a 2.5 pg en el producto de digestión. Este valor, de todas formas, resultó apto para establecer conclusiones en todas las muestras estudiadas por lo que no se recurrió a separación de la matriz. Obviamente, otro parámetro de calidad afectado es la frecuencia de análisis debido a la necesidad de disminuir notablemente la rampa de temperatura como puede observarse en el programa del horno.

#### **6.2.3.4. Plomo**

Las determinaciones de plomo realizadas tuvieron diferente tratamiento dependiendo de la matriz y de la concentración esperada del Pb. La valoración en



plantas se realizó por espectrometría de absorción atómica con llama en las condiciones ya descritas en un trabajo de nuestro grupo<sup>182</sup>.

En el caso de aguas filtradas, la baja concentración del analito, nos llevó a utilizar absorción atómica con horno de grafito. Análogamente se trabajó sobre sedimentos y sólidos suspendidos donde la alta dilución aplicada para disolver por un lado y disminuir el efecto matriz por el otro, obligó a trabajar también con niveles bajos de concentración.

Las muestras de agua filtrada contenían, como veremos en el capítulo de aplicaciones, cantidades variables de plomo. Sobre algunas de ellas, adecuadamente diluídas a fin de disminuir la interferencia debida a concomitantes, se realizó la determinación directa de plomo, sin separaciones previas ni acondicionamiento, excepto por la adición en el punto de inyección de 10  $\mu\text{l}$  de modificador de matriz  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  2.5% +  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  0.1% a 30  $\mu\text{l}$  de muestra tal cual. La programación del horno y performance del método se muestran en la Tabla 6.10.

Sobre las muestras acuosas que no aceptaron dilución, se observó un marcado efecto matriz que disminuía notablemente la sensibilidad (aún en presencia de modificadores) por alteración de las condiciones de atomización del plomo. Para proceder a cuantificarlo se acopló al horno de grafito un sistema en flujo automático para separar concomitantes y cuantificar "en línea" eliminando todo manipuleo de la muestra. Este acoplamiento será descrito en detalle más abajo.

Las muestras de sedimentos digeridos por microondas, diluídas previamente con agua deionizada (1:10), se analizaron como se indica en la Tabla 6.11. Se utilizó el mismo modificador de matriz y en iguales proporciones que para agua.

**Tabla 6.10.** Condiciones y performance para la valoración de plomo en aguas.

<p><b>Equipo Shimadzu AA 6501</b></p> <p>Lámpara de cátodo hueco: plomo</p> <p>Corriente: 14 mA</p> <p><math>\lambda</math>: 283,3 nm;Ancho de ranura: 0,2 nm</p> <p>Corrección de fondo: Deuterio</p>
--

<p><b>Parámetros de medición</b></p> <p>Modo de conversión a concentración: Curva de calibración</p> <p>Orden de la curva de calibración: Primer orden</p> <p>Procesamiento de señal: altura de pico</p> <p>Volumen : 40 <math>\mu</math>l.</p> <p>Unidad de concentración: ng/ml (ppb)</p> <p>Número de estándares: 5</p>
--

**Condiciones de repetitividad**

	Nº. de replicados	Máx.Nº.de replicados	Coef. de variación límite (CV%)
<b>Medición blanco</b>	2	5	10
<b>Estándares (Adición estándar)</b>	2	5	10
<b>Muestra (adición estándar simple)</b>	2	5	10

**Programa de horno**

Paso#	1	2	3	4	5
<b>Temp.(oC)</b>	80	120	500	500	1800
<b>Tiempo (seg)</b>	10	20	20	10	2
<b>Argón (l/min)</b>	1.0	1.0	1.0	1.0	No
<b>Modo</b>	Rampa	Rampa	Rampa	"Step"	"Step"
<b>Prepico (seg) *</b>	-----	-----	-----	-----	2

# Pasos 1 y 2:secado ó "dry"; 3 y 4: calcinación ó "ash"; 5: atomización.

\* El detector deja de estar "ciego". La señal se registra e integra 2 seg antes del paso 5.a los 8 seg. de comenzado el segundo paso de "ash".

Tabla 6.10. (Continuación)

<b>Performance analítica</b>	
<b>Curva de calibración:</b> $Abs = K_1 \cdot [C] + K_0$ ; $K_0 = 0,0000$ , $K_1 = 0,0109$ .	
<b>Sensibilidad</b> = 0,40 ng/ml ( $A = 0,0044$ )	
<b>Masa característica</b> (mo) = 16 pg	
<b>Ambito de linealidad</b> = hasta 40,0 ng/ml	
<b>CV(%)</b> = 7,5	
<b>Factor de recuperación</b> (vs.SRLS 2 del NRCC) = 82,2 %	
<b>Límite de cuantificación</b> = 2 ng/ml	
<b>Frecuencia de muestreo</b> = 20 h <sup>-1</sup> .	

Tabla 6.11. Programa y performance del análisis de Pb en sedimentos.

Paso#	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Temp.(°C)	80	80	130	130	500	500	850	850	1800
Tiempo (seg)	5	4	20	20	20	5	10	15	2
Argón (l/min)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	No
Modo	Rampa	"Step"	Rampa	"Step"	Rampa	"Step"	Rampa	"Step"	"Step"
Prepico (seg)*	-----	-----	-----	-----					2

# Pasos 1,2,3,4: secado ó "dry"; 5,6,7,8: calcinación ó "ash"; 9: atomización.

\* El detector deja de estar "ciego". La señal se registra e integra 2 seg antes del paso 9, esto es a los 13 seg. de comenzado el cuarto paso de "ash".

<b>Performance analítica</b>	
<b>Curva de calibración:</b> $Abs = K_1 \cdot [C] + K_0$ ; $K_0 = 0,0000$ , $K_1 = 0,0062$ .	
<b>Sensibilidad</b> = 0,70 ng/ml ( $A = 0,0044$ )	
<b>Masa característica</b> (mo) = 28 pg	
<b>Ambito de linealidad</b> = hasta 40 ng/ml	
<b>CV(%)</b> = 8,6	
<b>Límite de cuantificación</b> = 4,0 ng/ml	
<b>Frecuencia de muestreo</b> = 10 h <sup>-1</sup> .	

## Separación de concomitantes en línea

En aquellas muestras de agua filtrada donde la interferencia de la matriz hacía muy difícil la valoración de plomo, se desarrolló un método para separar los interferentes en línea. Este método consiste en el acoplamiento de un sistema en flujo al atomizador electrotérmico (horno de grafito) del equipo de absorción atómica.

El diagrama de bloques para este sistema acoplado de análisis (FIA-ETA-AAS) se muestra en la Figura 6.7. En el sistema en flujo se han utilizado válvulas solenoides de tres vías (representadas por círculos en la figura) accionadas secuencialmente a través de la incorporación de una plaqueta controladora comercial que, comandada por una PC y programación adecuada, permite la automatización del ciclo separación-análisis. La separación de interferencias se realiza mediante el "secuestro" ó "concentración" del analito con una resina complejante Chelex 100 (iminodiacetato, Merck Química, 200 mesh) con el que se empaca una microcolumna que se ensambló directamente en el brazo del muestreador automático del horno de grafito con el objeto de hacer más efectivo el proceso de elución-inyección.

Los pasos que involucra el proceso de separación de la matriz, concentración del analito y su posterior eliminación libre de interferencias se muestran en la Figura 6.8 y se pueden describir de la siguiente manera:

- 1) Lavado del conducto de muestra con nueva muestra para minimizar el efecto de "arrastre" del que hablamos en el capítulo 5.
- 2) Preacondicionamiento de la columna con buffer de pH=5.50 preparado a partir de HAcO (c) y NH<sub>3</sub> (c). (El sistema HAcO/NH<sub>4</sub>AcO se prefiere al HAcO/NaAcO dado el menor valor de blanco encontrado para el primero).

- 3) Secuestro del analito. (Nótese que la cantidad de muestra retenida se mide en tiempo de concentración recordando los muestreos en base tiempo de los que hablamos en el capítulo 5).
- 4) Lavado del sistema y eliminación de las interferencias (matriz salina).
- 5) Acoplamiento sistema de flujo-horno-espectrómetro y elución del analito con ácido nítrico. En este punto se adiciona el modificador de matriz y se utiliza el mismo programa que en la Tabla 6.10, alcanzándose la misma performance excepto por la frecuencia de muestreo que se redujo a  $10 \text{ h}^{-1}$ .

Aquí debe tenerse en cuenta que el factor de dilución que recibe la muestra está dado por el tiempo de concentración del analito, que a una velocidad de flujo de  $1.0 \text{ ml/min}$  determina el volumen de muestra tomado y por el volumen emitido en el proceso de elución. En nuestro caso, ya que se alcanzaron valores óptimos de límite de detección con la técnica, el factor de dilución aplicado fue 1. Muestras más concentradas ó más diluídas pueden ser cuantificadas en línea, optimizando las variables tiempo de concentración (ó velocidad de flujo) y volumen de elución del analito.<sup>2</sup>

## Discusión

### a) Selección del modificador de matriz

El modificador de matriz utilizado para la cuantificación de plomo fue seleccionado con un criterio similar al caso de cadmio y con el objeto de disminuir la interferencia por cloruros volátiles. En este caso, los mejores resultados se obtuvieron con la adición de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , si bien la sensibilidad fue seriamente afectada respecto de la informada en bibliografía para plomo en agua<sup>186</sup>.

---

<sup>2</sup> Obviamente, variarán en este caso los parámetros de mérito alcanzables en particular, la frecuencia de muestreo.

Si bien no tenemos realizado experiencias que permitan establecer un mecanismo de acción de los modificadores de matriz en la atomización de plomo en horno de grafito, podría llegar a ocurrir un proceso similar al de cadmio esto es, la formación de un compuesto estable con fosfatos. De hecho, Welz <sup>187</sup> ha encontrado evidencias experimentales (ver apéndice del capítulo 4) que muestran que el momento y escenario de la formación del cloruro interferente es la fase condensada.

Respecto de la acción del  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , suponemos que puede proporcionar una estabilización adicional por la formación de una capa de  $\text{MgO}$  en la superficie del horno la que podría llegar a actuar como sustrato para el analito a través de mecanismos de fisisorción ó quimisorción según se postula en la bibliografía<sup>188,189</sup>.

Contrariamente a lo que expresa la bibliografía<sup>190,191</sup>, no hemos obtenido buenos resultados con el uso de sales de paladio como modificadores de matriz para Pb. Hemos evidenciado, por el contrario, la presencia de un doble pico en el estadio de atomización, tal como informa Dabeka<sup>192</sup>, el que podría atribuirse a una forma refractaria del Pb del tipo Pb-C-Pd que permanece, aún en condiciones de atomización de 2700°C.

#### b) Separación en línea de Pb.

Los problemas analíticos que implican el aislamiento de la matriz para poder valorar un analito en particular, han encontrado solución con la aparición de las técnicas acopladas de análisis que involucran, el "acoplamiento" de dos ó más técnicas ó instrumentos poderosos para obtener un efecto sinérgico en la performance total con respecto a la que se obtendría utilizándolas por separado. Las cromatografías líquida y gaseosa interfaceadas con espectrometría de masa ó con instrumentos de absorción y/o emisión atómica son ejemplos de la excelente performance de estos sistemas que marcan un "hito" en la química analítica: separación-preconcentración-valoración en línea<sup>193</sup>.

El análisis por inyección en flujo es, tal como dijéramos en el capítulo 5, una técnica que puede afrontar los distintos pasos del problema analítico de manera simple, versátil y económica permitiendo instrumentar en línea: reacciones de derivatización, separación, manipuleo y acondicionamiento de muestras para detección simple y múltiple, implementación de sensores químicos (bioquímicos) en flujo, etc.<sup>194</sup>.

En este trabajo, hemos separado los componentes de la matriz de muestras de agua filtradas para el análisis posterior de Pb por atomización electrotérmica, utilizando la separación en línea a través de una resina quelante. Si bien, existen en la bibliografía precedentes sobre este tipo de técnicas separativas en línea con distintas formas de detección<sup>195-197</sup>; la novedad reside en el punto de inserción de la columna separativa. En efecto, la incorporación de una columna pequeña empacada con Chelex-100 en el mismo tipo de inyección permite recuperar completamente el analito con mínima dilución debido a la escasa separación entre los distintos componentes de la configuración FIA utilizada (ver capítulo 5).

O sea que, la introducción en línea de una microcolumna "secuestrante" de metales pesados, sumada a la especificidad de un detector de absorción atómica y a la alta sensibilidad obtenible al utilizar los atomizadores electrotérmicos como productores de átomos nos ha permitido "sinergizar" la potencialidad de la técnica analítica por encima de las posibilidades de sus componentes individuales.

#### 6.2.3.5. Cobre y Cinc

Tratamos estos dos elementos en conjunto debido a que sus niveles de concentración en medios naturales son relativamente altos. (Recordemos que no se consideran "tóxicos", excepto que estén concentrados).

La cuantificación en plantas y suelos se realizó de acuerdo a la metodología sugerida por EPA<sup>14</sup>.



En aguas filtradas, el análisis se realizó por absorción atómica con horno de grafito, utilizando programas desarrollados en ocasión de este estudio con el criterio de cuantificar con el mínimo manipuleo de muestra.

**Tabla 6.12.** Condiciones y performance para la valoración de cinc en aguas.

<p><b>Equipo Shimadzu AA 6501</b>  Lámpara de cátodo hueco: cinc  Corriente: 8 mA  <math>\lambda</math>: 213,9 nm  Ancho de ranura: 0,5 nm  Corrección de fondo: Deuterio</p>
<p><b>Parámetros de medición</b>  Modo de conversión a concentración: Curva de calibración  Orden de la curva de calibración: Primer orden  Procesamiento de señal: altura de pico  Volumen : 20 <math>\mu</math>l.  Unidad de concentración: ng/ml (ppb)  Número de estándares: 5</p>

**Condiciones de repetitividad:** ver Tabla 6.10

**Programa de horno**

Paso#	1	2	3	4	5
Temp.(oC)	80	120	500	500	1300
Tiempo (seg)	10	20	20	5	2
Argón (l/min)	1.0	1.0	1.0	1.0	No
Modo	Rampa	Rampa	Rampa	"Step"	"Step"
Prepico (seg) *	-----	-----	-----	-----	2

# Pasos 1 y 2:secado ó "dry"; 3 y 4: calcinación ó "ash"; 5: atomización.

\* El detector deja de estar "ciego". La señal se registra e integra 2 seg antes del paso 5, esto es a los 3 seg. de comenzado el segundo paso de "ash".



Tabla 6.12. (Continuación)

<b>Performance analítica</b>
<b>Curva de calibración:</b> $Abs=K_1.[C] + K_0$ ; $K_0=0,0000$ , $K_1=0,0738$ .
<b>Sensibilidad</b> = 0,060 ng/ml ( $A=0,0044$ )
<b>Masa característica</b> ( $m_0$ ) = 1,2 pg
<b>Ambito de linealidad</b> = hasta 4,0 ng/ml
<b>CV(%)</b> = 3,7
<b>Factor de recuperación</b> (vs.SRLS 2 del NRCC) = 92,2 %
<b>Límite de cuantificación</b> = 0,3 ng/ml
<b>Frecuencia de muestreo</b> = 20 h <sup>-1</sup> .

Tabla 6.13. Condiciones y performance para la valoración de cobre en aguas.

<b>Equipo Shimadzu AA 6501</b>
Lámpara de cátodo hueco: cobre
Corriente: 6 mA
$\lambda$ : 324,8 nm; Ancho de ranura: 0,5 nm
Corrección de fondo: Deuterio

**Condiciones de repetitividad y parámetros de medición:**

ver Tabla 6.10 y 6.12 respectivamente.

**Programa de horno**

Paso#	1	2	3	4	5
Temp.(oC)	80	120	500	500	2300
Tiempo (seg)	10	20	20	5	2
Argón (l/min)	1.0	1.0	1.0	1.0	No
Modo	Rampa	Rampa	Rampa	"Step"	"Step"
Prepico (seg) *	2-----	-----	-----	-----	2

# Pasos 1 y 2:secado ó "dry"; 3 y 4: calcinación ó "ash"; 5: atomización.

\* El detector deja de estar "ciego". La señal se registra e integra a los 3 seg. del segundo paso de "ash".

**Tabla 6.13. (Continuación)****Performance analítica****Curva de calibración:**  $Abs = K_1 \cdot [C] + K_0$ ;  $K_0 = 0,0000$ ,  $K_1 = 0,0155$ .**Sensibilidad** = 0,28 ng/ml ( $A = 0,0044$ )**Masa característica** ( $m_0$ ) = 5,7 pg**Ambito de linealidad** = hasta 60,0 ng/ml**CV(%)** = 5,5**Factor de recuperación** (vs.SRLS 2 del NRCC) = 97,2 %**Límite de cuantificación** = 1,0 ng/ml; **Frecuencia de muestreo** = 20 h<sup>-1</sup>.**Discusión**

Las determinaciones de Cu y Zn en aguas naturales no evidenciaron interferencias de matriz. Si bien la temperatura de atomización de Zn es mucho más baja que la de Cu, la eliminación completa de los componentes de la matriz de muestra se realizó a 500°C con total recuperación del analito y sin necesidad de adición de modificadores de matriz. Como el trabajo desarrollado se limitó a la optimización de los programas de horno que se presentaron más arriba, no extenderemos la discusión sobre estos elementos en particular.

**6.2.3.6. Arsénico y Mercurio**

Las determinaciones de As y Hg se presentan juntas dado que para ambas se ha utilizado el sistema de generación de vapor de la Figura 6a.1. Se han realizado exclusivamente sobre aguas filtradas puesto que, si bien los analitos fueron detectados, sus niveles de concentración están por debajo de nuestro límite de cuantificación y no se pueden sacar conclusiones en relación a sedimentos y plantas.

La determinación de Hg se ha realizado sobre 10 ml de muestra filtrada en HCl 6 M y se utilizaron 0,4 ml de SnCl<sub>2</sub> al 20% para producir la reducción a Hg<sup>0</sup>. La cuantificación se realizó a través de una curva de calibración de agregado patrón

simple. El volumen dentro del reactor se mantuvo constante para obtener idénticas condiciones de transferencia. Las condiciones instrumentales y la performance alcanzada se muestran en la Tabla 6.14.

**Tabla 6.14.** Condiciones y performance para la valoración de Hg en aguas.

**Equipo Varian AA 5, Registrador-integrador Varian 4290.**

Lámpara de cátodo hueco: mercurio

Corriente: 3 mA

$\lambda$ : 253,7 nm

Ancho de ranura: 10 nm

Corrección de fondo: -----

**Características de la medición**

Modo de conversión a concentración: Curva de calibración, agregado patrón

Orden de la curva de calibración: Primer orden

Procesamiento de señal: altura de pico

Volumen de muestra: 10 ml de muestra en HCl 1+1

Velocidad de carrier: 8 ml/min (interrupción: 20 seg. y posterior transferencia a la celda)

Volumen de reductor: 0,4 ml (dispensación automática optativa).

Unidad de concentración: ng/ml (ppb)

Número de estándares: 5

**Performance analítica (\*)**

**Curva de calibración:**  $h = 0,0000 + 10 \text{ (Hg) ng/ml}$

**Límite de cuantificación** = 0,5 ng/ml

**Ambito de linealidad** = hasta 80,0 ng/ml

**CV(%)** = 6,5

**Factor de recuperación** (vs.SRLS 2 del NRCC) = 95,0 %

**Frecuencia de muestreo** = 10 h<sup>-1</sup>.

(\*) No se reporta  $m_0$  porque la señal se obtiene en unidades arbitrarias (mm)



La valoración de As se ha realizado sobre 10 ml de muestra filtrada en HCl 1+1. Se ha realizado un pretratamiento que involucra: la prerreducción con KI (sólido) a 60°C durante 1 hora para que todo el arsénico aparezca como As(III); y la eliminación de nitratos, en los casos en que correspondiera, por adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hasta vapores de SO<sub>3</sub><sup>198</sup>. La reducción a H<sub>3</sub>As se realizó con una solución de NaH<sub>4</sub>B en medio alcalino, adicionada desde un dispensador automático a velocidad constante. Los productos de reducción (H<sub>3</sub>As e H<sub>2</sub> se transfieren a través de una corriente de argón hasta la celda de cuarzo interpuesta en el camino óptico de la lámpara de cátodo hueco de As. La celda se calienta con una llama oxidante de aire/acetileno, para producir el vapor atómico cuya absorción se mide.

Las condiciones instrumentales, operación y performance se muestran en la Tabla 6.15.

**Tabla 6.15.** Condiciones y performance para la valoración de As en aguas.

**Equipo Varian AA 5, Registrador-integrador Varian 4290.**

Lámpara de cátodo hueco: arsénico

Corriente: 8 mA

$\lambda$ : 253,7 nm; Ancho de ranura: 50 nm

Corrección de fondo: -----

**Características de la medición**

Modo de conversión a concentración: Curva de calibración con agregado patrón

Procesamiento de señal: área de pico

Volumen de inyección: 10 ml de muestra en HCl 1+1

Velocidad de carrier: 8 ml/min (sin interrupción de flujo de carrier)

Volumen de reductor: 5,0 ml (dispensación automática).

Unidad de concentración: ng/ml (ppb)

Número de estándares: 5

**Tabla 6.15. (Continuación)**

<b>Performance analítica (*)</b>
<b>Curva de calibración:</b> $\text{área} = 0,0000 + 1500 (\text{As}) \text{ ng/ml}$
<b>Límite de cuantificación</b> = 5,0 ng/ml
<b>Ambito de linealidad</b> = hasta 100,0 ng/ml
<b>CV(%)</b> = 7,3
<b>Factor de recuperación</b> (vs.SRLS 2 del NRCC) = 78,5 %
<b>Frecuencia de muestreo</b> = 5 h <sup>-1</sup> .
(*) No se reporta $m_0$ porque la señal se obtiene en unidades arbitrarias (mm)

### Discusión de los resultados

Las dimensiones del reactor y la distancia reactor-celda fueron cuidadosamente estudiados para obtener la mejor sensibilidad, tratando de disminuir el volumen muerto tal como indicáramos en el capítulo 4.

Las dimensiones óptimas de la celda atómica para Hg siguen el mismo patrón que para el caso de atomizadores electrotérmicos (ver ecuación 4.20). O sea que, a través del aumento de la longitud y la disminución de la sección transversal se logra la mayor sensibilidad. En el caso de As la situación es diferente dado que la celda no tiene un rol "pasivo" ya que allí, la arsina liberada se transforma en átomos con la asistencia de la llama de aire/acetileno. Las dimensiones del tubo condicionan de esta manera la posibilidad de producir átomos y la sensibilidad alcanzable<sup>199</sup>.

La velocidad de flujo del gas de arrastre (nitrógeno especial) fue seleccionada teniendo en cuenta los procesos de transferencia de masa de los que habláramos en el capítulo 4.

Como la generación de Hg involucra dos etapas: i) reacción química en condiciones de agitación constante y flujo de carrier interrumpido y ii) posterior transferencia a la celda de atomización, no es necesario disminuir el flujo de carrier

pudiéndose trabajar con flujos altos y dispersión mínima y cuantificar en altura de pico. En nuestro caso se utilizó 8 ml/min como flujo óptimo de gas argón.

Para el caso de arsénico, se disminuyó el flujo de argón a la mitad dado que las secuencias de producción de arsina y su transferencia a la celda se realizan, con agitación constante y sin interrupción del flujo de carrier. El valor de 4 ml/min se elige como resultado del compromiso del que hablábamos en el capítulo 4. (ver ecuación 4.32).

#### **6.2.4. Análisis de concomitantes.**

Además de las determinaciones de pH y conductividad que se realizaron en campo, se cuantificaron los concomitantes habituales en la corteza terrestre a fin de explicar la distribución de los distintos tóxicos en el medio acuático como veremos en el capítulo de aplicaciones. Los métodos aplicados para alcalinidad, dureza, cloruros, calcio, sodio, magnesio, potasio, consumo de oxígeno, etc. no serán descriptos, dado que son estándares y pueden ser consultados en la bibliografía<sup>200</sup>.

La valoración de compuestos nitrogenados, en especial nitratos y nitritos, merece mucho interés debido a su toxicidad inherente y su potencialidad como indicador de contaminación microbiológica en aguas<sup>201,202</sup>. Además, como las dos especies presentan en general, concentraciones marcadamente diferentes en aguas naturales (el nitrito aparece a nivel de vestigios) y la forma reducida se convierte con facilidad en la oxidada, la especiación y cuantificación de las mismas se complica y por lo tanto, le daremos un tratamiento especial.

##### **6.2.4.1. Especiación simultánea de nitratos y nitritos**

La relación de nitratos/nitritos en aguas naturales se ve afectada por una serie de factores que regulan el ciclo biológico del nitrógeno en los sistemas acuáticos

como por ejemplo, el potencial rédox del sistema acuático, el ambiente microbiológico, la profundidad a la que se realiza el muestreo (las aguas son mas pobres en oxígeno al aumentar la profundidad), etc.<sup>203</sup>.

Estas condiciones de contorno influyen sobre la determinación de ambos, sea ésta secuencial ó simultánea puesto que la relación nitrito/nitrato varía desde 1:1 hasta 1:10000 y además los contenidos habituales de nitrito están en el orden de la ppb <sup>204</sup>.

Por otra parte, el trabajo analítico debe realizarse inmediatamente después de la recolección de muestras debido a que el almacenamiento prolongado altera la composición<sup>205</sup>.

En este trabajo hemos estudiado la determinación simultánea de nitratos y nitritos en flujo utilizando detección espectrofotométrica del azo colorante formado entre nitrito y el ácido sulfanílico y la  $\alpha$ -naftilamina<sup>206</sup>.

La valoración de nitratos se realizó previa reducción en línea a través de una columna de cadmio con posterior detección espectrofotométrica del azocolorante. La reducción parcial reproducible en línea, que se presenta por primera vez en este estudio, se emplea para extender el ámbito dinámico de linealidad en el análisis de nitratos y poder aplicarlo a cualquier sistema acuático que se requiera estudiar con mínimos cambios en la configuración FIA.

### **Pasos experimentales**

#### **a) Preparación de reactivos, muestras y estándares.**

Ver en el apéndice.

#### **b) Sistema de flujo:**

El esquema del diagrama de flujo utilizado y el relleno de la columna se cadmio se muestran en la Figura 6.9. La reacción de formación del azocolorante fue monitoreada a 520 nm con un espectrofotómetro UV-visible al que se acopló una



celda de flujo de las características descritas para cromo. Las longitudes de los reactores y de "loops" y las velocidades de flujo se señalan en la Figura y corresponden a una relación nitrito/nitrato 1:100.

### c) Procedimiento

Las muestras y todos los estándares preparados conteniendo nitrato y nitrito fueron introducidos en el loop de muestra y transportados al detector por la corriente de carrier. La válvula de inyección tiene dos posiciones **A** y **B**. En la posición **A** (análisis de nitrito y muestreo de nitrato), la muestra que contiene a los dos analitos evita la columna de reducción, se mezcla con el buffer en el punto **1** y con el reactivo colorimétrico en el punto **2**, y se realiza la determinación de nitrito (ver figura). En la posición **B** (análisis de nitrato+nitrito y muestreo de nitrito), la muestra pasa por la columna de reducción, se une al buffer en el punto **1** y al reactivo colorimétrico en el punto **2** y se realiza la determinación de nitrato+nitrito. La posición **B** se obtiene simplemente moviendo hacia abajo el bloque central del inyector-conmutador tal como indicáramos en el capítulo 5.

Las condiciones para la determinación de nitritos en nivel de ppb y para nitrito+nitrato en la relación 1:100 (a modo de ejemplo) se muestran en la Tabla 6.16.

**Tabla 6.16.** Condiciones para la determinación simultánea  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  (1:100)  
*Canal Nitrito*

Vol.de muestra en el canal de nitrito = 250 $\mu\text{l}$ (loop = 50 cm)
Velocidad de flujo de carrier = 1.28 ml/min.
Longitud del reactor: 100 cm (helicoidal)
Veloc.de flujo reactivo colorimétrico = 1,28 ml/min
Long. amortiguador de pulso canal de reactivo = 50 cm
Detección: espectrofotometría visible (520 nm)
Procesamiento de señal: altura de pico
Coefficiente de dispersión = 1,3
Conversión a concentración: curva de calibración



**Tabla 6.16.***Canal Nitrato*

Vol.de muestra en el canal de nitrato = 10 µl (loop = 2 cm).
Relleno de la columna: Cd <sup>3</sup>
Longitud de la columna: 0,65 cm (corresponde a un volumen de lecho vb=0,02 cm <sup>3</sup> )
Velocidad de flujo de carrier = 1,28 ml/min
Procesamiento de señal: altura de pico
Coefficiente de dispersión: 20
Conversión a concentración: curva de calibración
(Las condiciones para la generación de color, procesamiento de señal y conversión a concentración se mantienen como en nitrito)

Para poder trabajar usando altura de pico para la cuantificación de nitratos, la señal obtenida debe ser corregida por la contribución de nitritos (nótese que el resultado es una suma y el coeficiente de dispersión para cada canal es distinto).

Las ecuación de corrección utilizada es:

$$h\text{NO}_3^- \text{ corregida} = (h\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)_{\text{medida}} - (k \cdot h\text{NO}_2^-);$$

donde "k" se obtiene midiendo una solución que contiene solamente NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en ambos canales y realizando el cociente:

$$h\text{NO}_2^- \text{ canal nitrato} / h\text{NO}_2^- \text{ canal nitrito}$$

En la Tabla 6.17 se muestra la performance analítica del método para ambos analitos (nitrito/nitrato: 1:100) y en la Tabla 6.18 las modificaciones "guía" para valorarlos en diferentes relaciones.

<sup>3</sup> El relleno de cadmio cobreado se utilizó para concentraciones mas bajas de nitrato como explicaremos luego..

**Tabla 6.17a.**Performance analítica Nitrito.

<b>Curva de calibración nitrito:</b> $h \text{ (cm)} = 0,025 + 70,3 \text{ (NO}_2^- \text{) (mg/l)}$ , $r=0,9998$
<b>Límite de cuantificación</b> = 0,004 mg/l
<b>Ambito de linealidad</b> = hasta 1,0 mg/l
<b>CV(%)</b> = 0,7
<b>Frecuencia de muestreo</b> = 25 h <sup>-1</sup>
<b>Validación:</b> cromatografía de iones (trazable test F 95% de confianza)

**Tabla 6.17a.**Performance analítica Nitrato.

<b>Curva de calibración nitrato:</b> $h \text{ (cm)} = 0,009 + 0,495 \text{ (NO}_3^- \text{) (mg/l)}$ , $r=0,9997$
<b>Límite de cuantificación</b> = 0,50 mg/l
<b>Ambito de linealidad</b> = hasta 10, mg/l
<b>CV(%)</b> = 2,5
<b>Frecuencia de muestreo</b> = 25 h <sup>-1</sup>
<b>Validación:</b> cromatografía de iones (trazable test F 95% de confianza)

**Tabla 6.18.** Guías para el análisis de distintas relaciones

Relac.NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Loop canal NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> *	Relleno de columna	Vol.del lecho (bv)
1:1	20 cm (i.d.=0,75 mm)	Cd (Cu)	0,10 ml
1:10	20 cm (i.d.=0,75 mm)	Cd	0,10 ml
1:100	2 cm (i.d.=0,4mm)	Cd	0,020 ml
1:1000	2 cm (i.d.=0,4mm)	Cd	0,010 ml

\* El loop en el canal de nitrito permanece constante para mantener el mejor límite de cuantificación.

**Discusión**

Las condiciones del sistema de flujo seleccionadas para este trabajo fueron establecidas como para:

- i) Analizar microcantidades de nitrito. (nivel de concentración ng/ml)

- ii) Determinar nitrito/nitrato en relación 1:100 manteniendo el nivel de concentración de nitritos en el orden de la ppb.
- iii) Realizar pequeñas modificaciones al sistema de manera de analizar relaciones desde 1:1 hasta 1:10000.

#### a) Valoración de nitrito

Se seleccionó un "loop" de muestra de 50 cm (volumen = 250  $\mu$ l) para obtener la máxima señal analítica que fuera compatible con que el pico no se desdoblara tal como viéramos en el análisis de Cr(VI).

La longitud del reactor (100 cm) fue seleccionada teniendo en cuenta el tiempo de contacto entre los reactantes y la dispersión de la señal analítica.

Se utilizó una velocidad de flujo de carrier de 1.28 ml/min, la que se adoptó como situación de compromiso para optimizar la relación señal/ruido.

En la Figura 6.10 se muestra la influencia de la longitud de reactor y del flujo de carrier en la señal obtenida.

#### b) Relación nitrito/nitrato 1:100

La determinación simultánea de nitritos y nitratos para relaciones del orden de 1:100 y niveles de concentración de nitrito de ng/ml requiere mantener las condiciones mencionadas más arriba para este último y reducir las señales de nitrato para "acomodarlas" en el ámbito de respuesta del detector. Para realizar esto último se estudiaron las variables que siguen:

1. Volumen de muestra: se utilizaron los volúmenes de muestra más pequeños compatibles con el diseño del inyector-conmutador, esto es 10  $\mu$ l (long. loop = 2 cm).
2. Potencial de reducción: se utilizaron limaduras de Cd en el proceso de reducción en lugar de las de Cd cobreado indicadas en la bibliografía<sup>203</sup>

aprovechando que el potencial de reducción del Cd es mucho menor que el de Cd/Cu lo que provoca una disminución en el rendimiento de nitrato.

3. Tiempo de contacto: Las variables que afectan al tiempo de contacto entre el metal y la solución y, de esta manera, el rendimiento de nitrato son: el área superficial del metal por unidad de volumen, el volumen del lecho (bv) de la columna y la velocidad de flujo. En la Figura 6.9b se muestra la columna que hemos seleccionado para el estudio.

La influencia del volumen del lecho se estudió para volúmenes variables entre 0.009 y 0.09 cm<sup>3</sup>. Se observó un incremento lineal de la relación de señales cuando se aumentó la longitud de la columna indicando que el nitrato presente en la muestra había sido reducido sólo parcialmente. La relación de señales se define como:  $(hNO_2^- + hNO_3^-)/hNO_2^-$ , donde  $hNO_2^-$  es la altura de la señal de nitrito y  $(hNO_2^- + hNO_3^-)$  es la altura de la señal suma.

Se observó además una disminución en el rendimiento de nitrato cuando se aumenta el flujo de carrier. La señal disminuyó un 25% cuando se elevó la velocidad de flujo de 1.28 a 1.60 ml/min.

Las experiencias descritas más arriba, demuestran que una longitud de columna de 0.65 cm (bv=0.02 cm<sup>3</sup>) y velocidades de flujo de carrier de 1.28 ml/min, permiten que las señales de nitrito y de nitrito+nitrato se acomoden en el mismo ámbito de trabajo (la misma altura para ambas señales), expandiendo el ámbito dinámico de linealidad para nitrato e incrementando la vida de la columna.

*Solución carrier:* La concentración de H<sup>+</sup> tiene una fuerte influencia en el proceso de reducción. Para prevenir la reducción de nitritos es necesario trabajar a un pH alto pero, no tan alto como para producir la precipitación de Cd(OH)<sub>2</sub> en la columna de reducción y disminuir su eficiencia. La selección apropiada del regulador de trabajo nos ha permitido evitar cambios de pH, prevenir la precipitación de cadmio por la acción del complejante adicionado a la solución

(Titriplex 1). evitar la formación de hidroxilamina y optimizar la reducción de nitrato.

La concentración de la solución reguladora (0.1 M) fue seleccionada teniendo en cuenta que: a) para valores menores que 0.1 M se obtenía una importante disminución de la señal cuando se aumentaba el número de determinaciones (probablemente debido al oxígeno disuelto que cambiaba el pH afectando la reducción de nitrato) y b) para valores mayores que 0.1 M se observaba efecto Schlieren (ver análisis de Cr(VI)).

A modo de conclusión podemos decir que a través del cuidadoso estudio de las variables que afectan la reducción de nitrato, sumadas a la posibilidad que presentan los sistemas en flujo de trabajar con tiempos constantes, es posible utilizar la reducción parcial reproducible como alternativa válida para expandir ámbitos de linealidad y cuantificar simultáneamente ambas especies nitrogenadas cualquiera sea la proporción en la que se encuentren en el medio natural.

Figura 6.1.  
Sistema en línea única con disolución en flujo para especiación de Cr(VI)

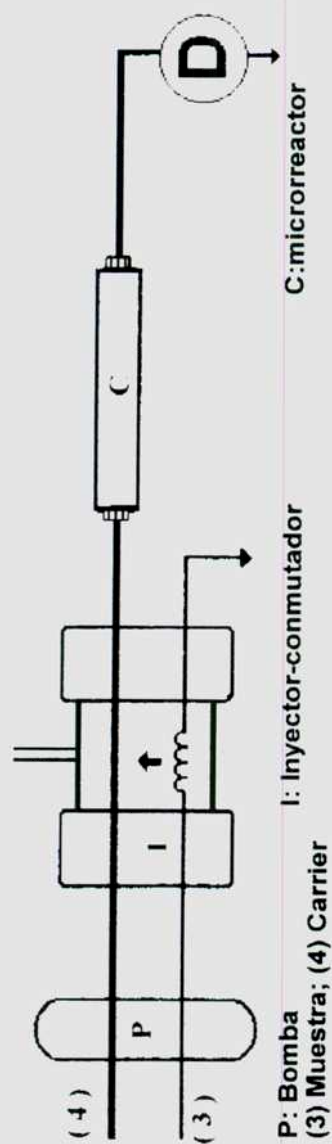
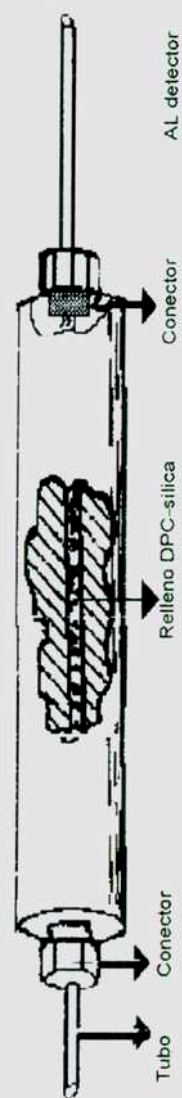
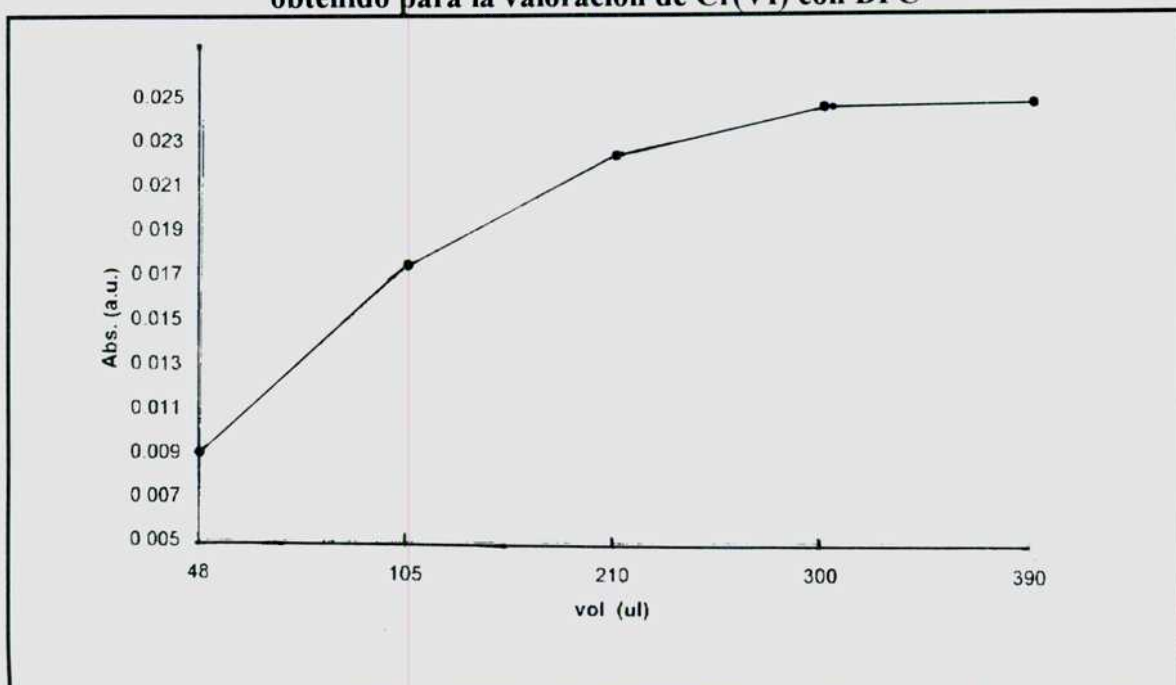


Figura 6.2  
Detalle de la columna de teflón empacada con DPC-sílice

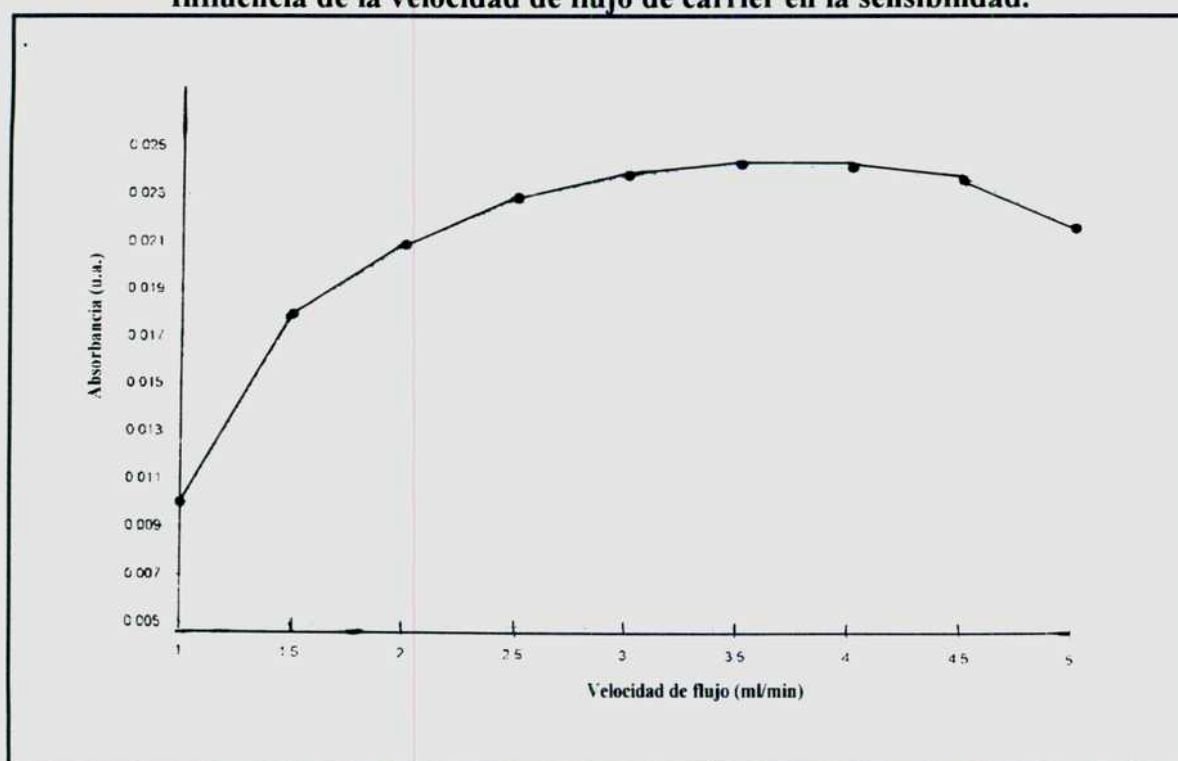




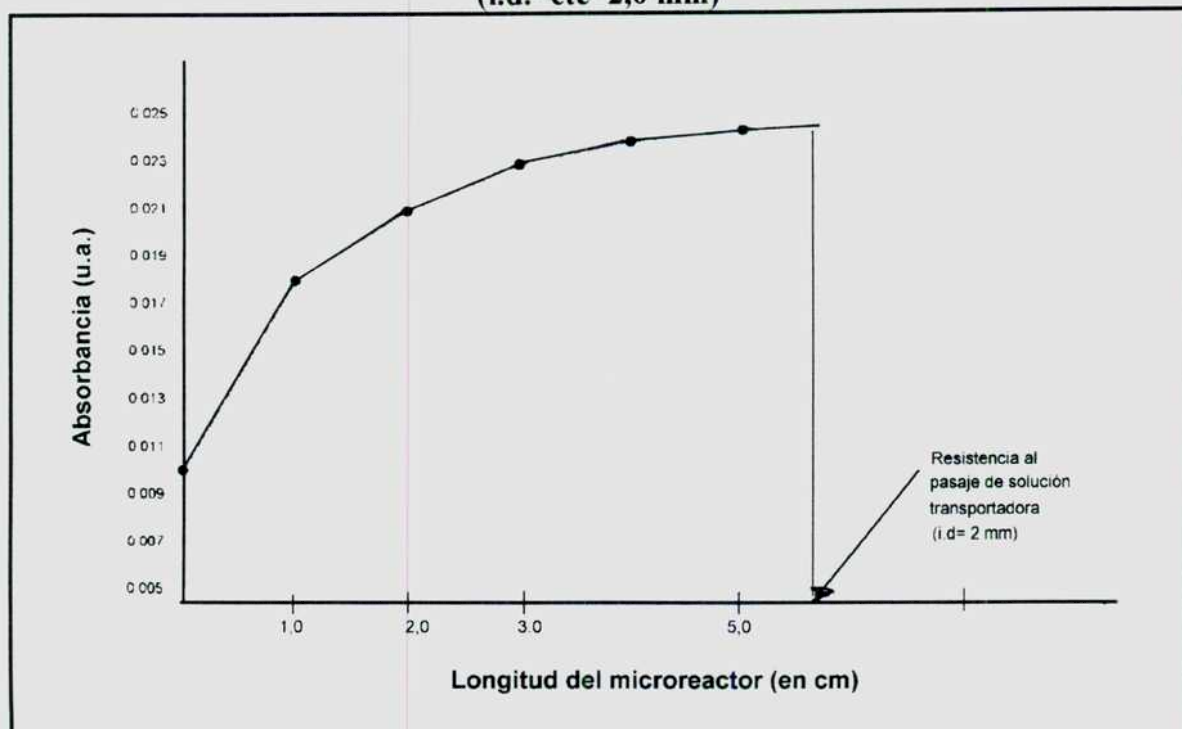
**Figura 6.3.**  
**Influencia del volumen de muestra inyectada (longitud del loop) en el transiente obtenido para la valoración de Cr(VI) con DPC**



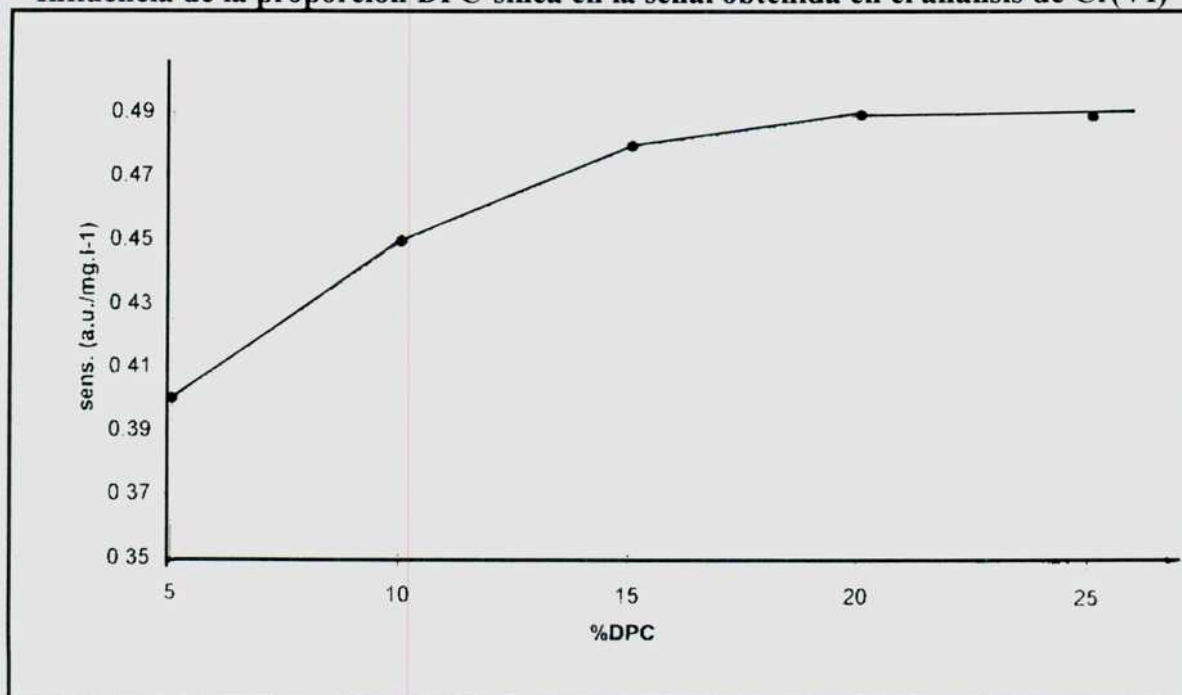
**Figura 6.4**  
**Influencia de la velocidad de flujo de carrier en la sensibilidad.**



**Figura 6.5**  
**Influencia de la longitud del reactor en la señal obtenida en el análisis de Cr(VI).**  
(i.d.=cte=2,0 mm)

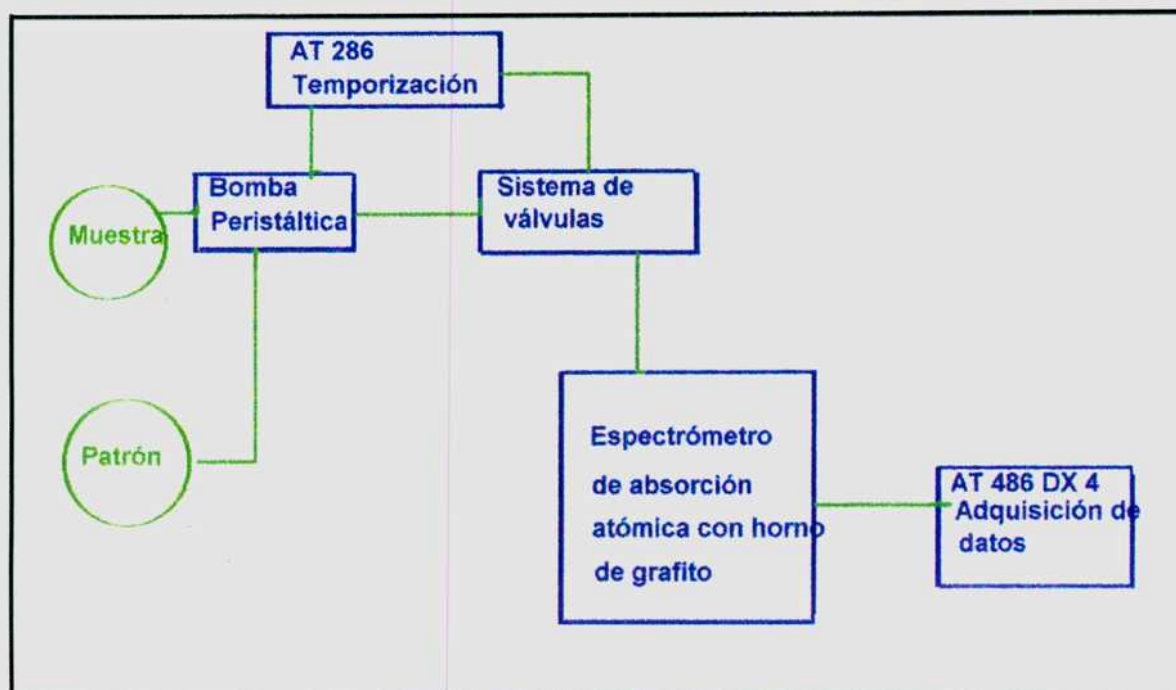


**Figura 6.6.**  
**Influencia de la proporción DPC-sílica en la señal obtenida en el análisis de Cr(VI)**





**Figura 6.7.**  
**Diagrama de bloques del sistema acoplado FIA-ETA-AAS**



**Figura 6.8**  
**Operaciones de separación-concentración-análisis de Pb por FIA-ETA-AAS**  
(Las válvulas solenoides de tres vías (círculos azules) se han temporizado con una plaqueta relay (Software en C++, 8 canales)

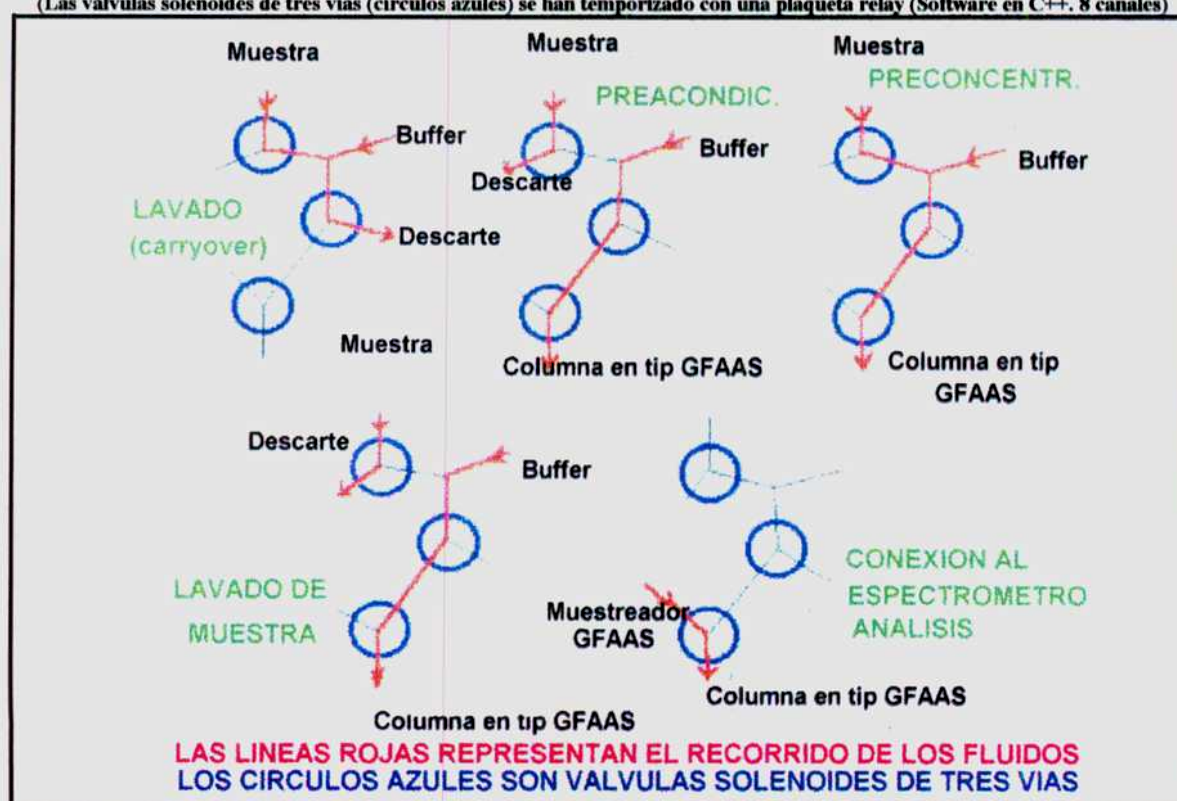
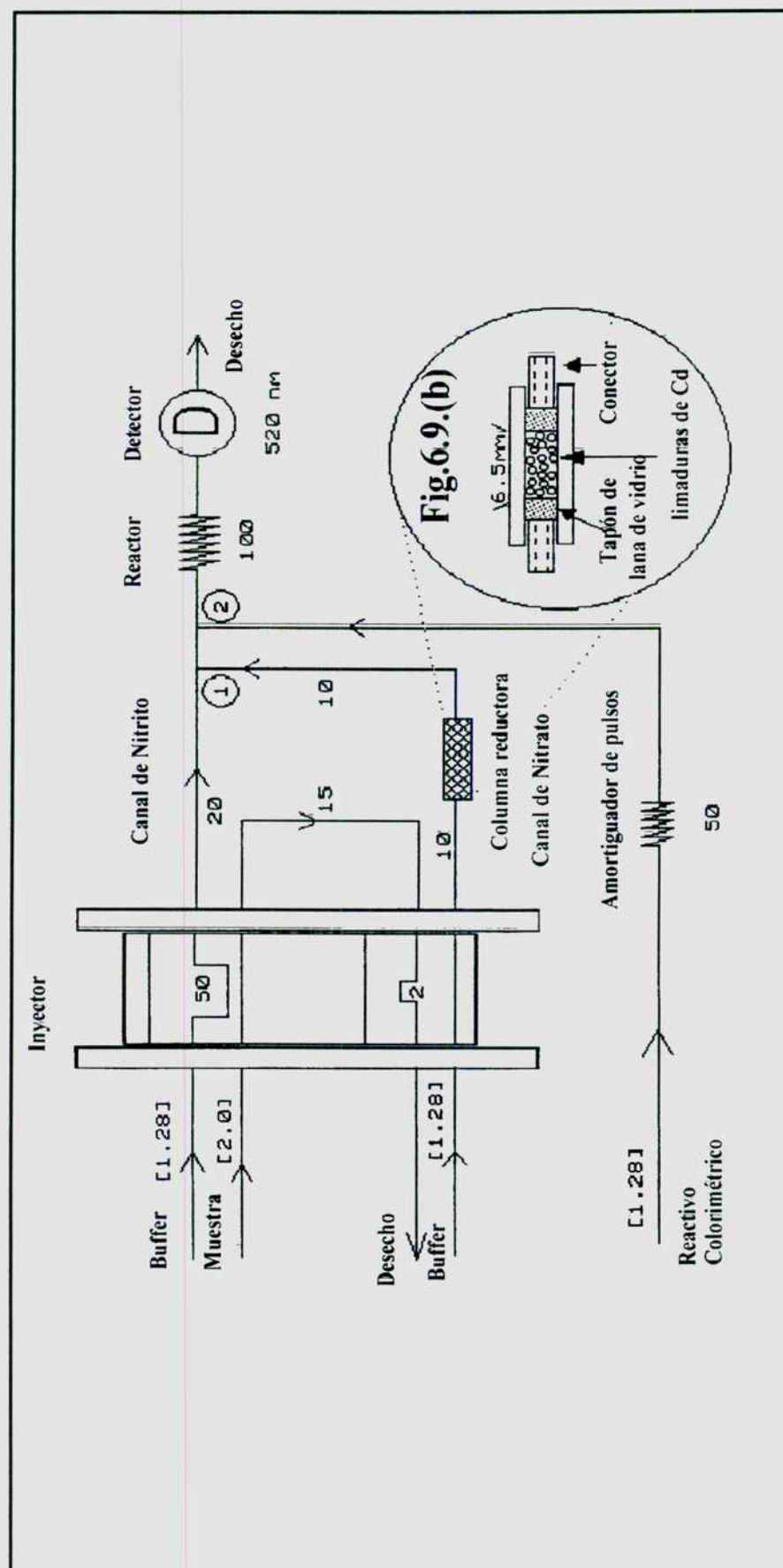
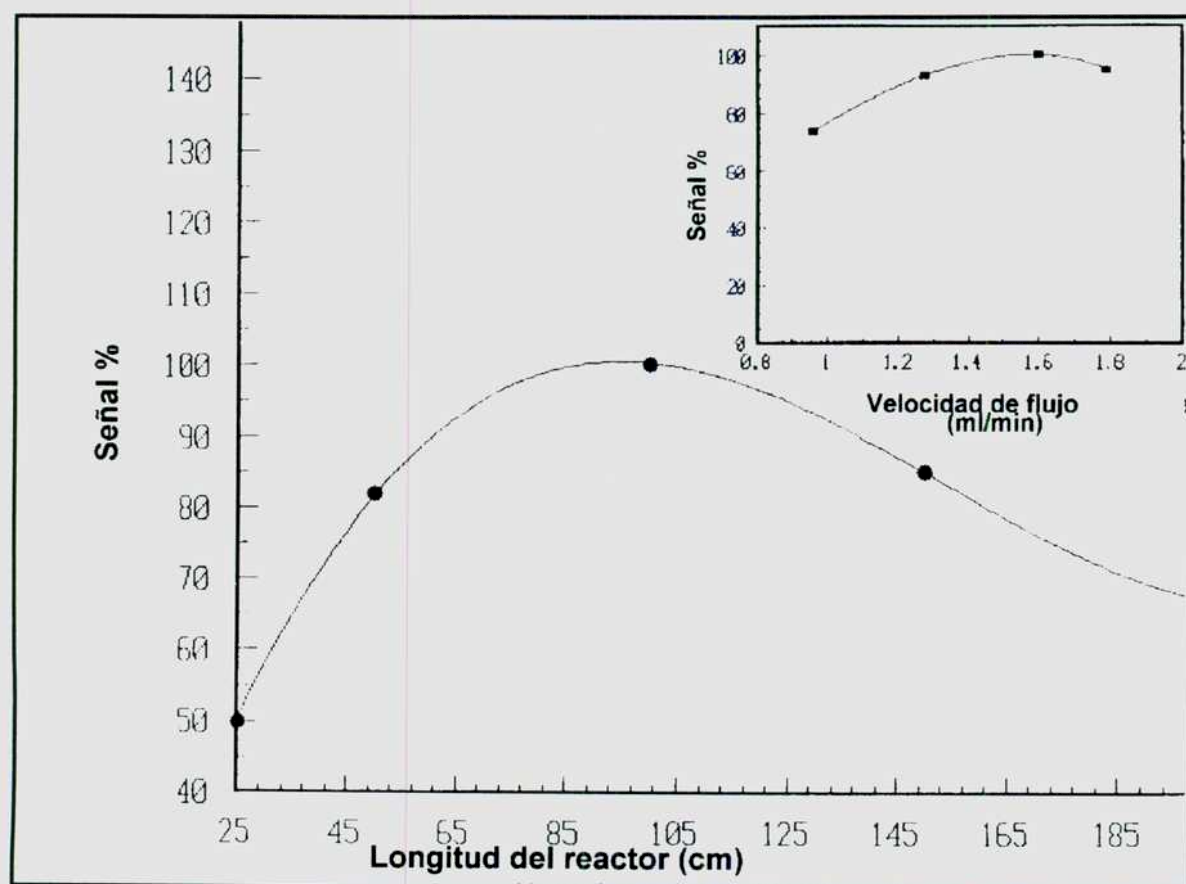


Figura 6.9  
Esquema del sistema de flujo para la valoración simultánea de nitratos y nitritos en línea,  
6.9b. Vista ampliada de la columna de reducción



**Figura 6.10**  
**Influencia de la longitud del reactor y de la velocidad de flujo de solución de transporte en la valoración simultánea de nitrogenados.**



**CAPITULO 7**

## Capítulo 7

### APLICACIONES: ZONA COSTERA DEL RÍO DE LA PLATA

#### 7.1. Introducción

Los grandes ríos y estuarios del planeta, lugares alrededor de los cuales se asientan las principales metrópolis, son áreas especialmente afectadas por las actividades humanas. Este “impacto” es el resultado de la producción masiva de desechos que, ya sea por la vía atmosférica (como la generación de hidrocarburos poliaromáticos como resultado de la combustión de combustibles fósiles) como por descargas directas de desechos que tienen como destino final el cuerpo de agua cercano.

El impacto producido es mayor cuando las descargas no tienen tratamiento previo, como es el caso de nuestro país, y comprenden desde desagües pluviales hasta efluentes industriales, cloacas y barros, de composición y efectos ecotoxicológicos desconocidos.

La degradación resultante de la calidad del ecosistema acuático resulta en alteraciones de sus propiedades físico-químicas y cambios en la comunidad biológica y tiene repercusión sobre toda la población, ya sea por los efectos directos que pueda tener sobre la salud, como por el encarecimiento del proceso de potabilización del agua, ó como deterioro del paisaje<sup>207</sup>.

El Río de la Plata, a pesar de sus enormes dimensiones: 35.000 km<sup>2</sup> y un caudal de 16.000-28.000 m<sup>3</sup>/seg<sup>17</sup>, que facilitan la dispersión y dilución de los desechos, no escapa al problema ya que la gran concentración de habitantes (1/3 de la población total de nuestro país) y la actividad industrial en los primeros 80 km de

costa, desde Buenos Aires hasta La Plata, producen efectos notorios en esta franja que es la que hemos estudiado con particular interés.

El estudio de la contaminación en el río se puede enfocar esencialmente desde dos puntos de vista. Uno de ellos es a través del uso de monitores biológicos, que actúan como medidores del grado de contaminación en las aguas<sup>208-210</sup> y el otro, utilizado en el presente trabajo, que se basa en la medición directa de la concentración del contaminante.

Ambas alternativas tienen sus ventajas e inconvenientes. El uso de bioindicadores permite tener una visión mas "realista" de la contaminación ya que una dada especie acuática "acumulará" aquellos tóxicos "disponibles", pero tendrá a su vez, el inconveniente de tener que encontrar esa especie en el ambiente a estudiar ó bien "sembrarla", lo que implica conocer los mecanismos a través de los cuales se produce la acumulación<sup>211,212</sup>.

La medición directa de la concentración de las especies tóxicas, si bien evita la utilización de un agente externo promediador de los niveles de contaminación, requiere el estudio de partición y especiación del tóxico<sup>6</sup> con los inconvenientes analíticos de los que hablábamos en el primer capítulo.

Esta necesidad de conocer la partición y especiación de los metales pesados objetos del estudio, obligó a realizar el análisis en sedimentos, sólidos suspendidos, aguas filtradas y plantas emergentes, así como a analizar compuestos "habituales" de la corteza terrestre, cuya presencia modifica la partición y especiación por cambios en la fuerza iónica<sup>213</sup>, en el potencial redox<sup>214</sup>, en el equilibrio ácido base<sup>215</sup>, en el de complejación<sup>216,217</sup>, el de precipitación<sup>218</sup>, etc.. En este contexto se han

realizado mediciones, ya sea en el campo ó en el laboratorio, como pH, conductividad, cloruros, compuestos nitrogenados, alcalinidad, dureza, oxígeno disuelto, sodio, potasio, sulfatos, etc. que se presentarán seguidamente.

## **7.2. Muestreos exploratorios**

### **7.2.1. Area de estudio.**

Se realizaron estudios en la zona costera del Río de la Plata en la franja de 5 km. que va desde la desembocadura del Río Luján hasta las proximidades de la ciudad de La Plata. Los primeros trabajos consistieron en dos muestreos "exploratorios", en octubre de 1992 y junio de 1993, con el objetivo de establecer cuáles son los metales pesados de interés y su nivel de concentraciones totales, así como su eventual variabilidad temporal. Ambos muestreos, en los que participaron miembros del laboratorio y personal del Servicio de Hidrografía Naval, se realizaron conforme una planificación previa sobre la carta H-118, en la que se diagramaron 24 piernas con una separación de 2 km. entre cada una de ellas, realizándose cuatro tomas sobre cada pierna. Dadas las características exploratorias de ambos muestreos, tal como señaláramos en el capítulo 2, se analizaron un gran número de muestras obtenidas con sesgo mínimo (sistemático con diseño previo de grilla).

Este diseño consistió en la recolección de más de 100 muestras de agua superficial (sumados los sitios supuestamente no poluídos) por muestreo, obtenidas y preservadas según indicáramos en el capítulo 6.

Como puntos de apoyo para posicionar luego la totalidad de las muestras (posicionador satelital Runco) se utilizaron los que siguen:



Tabla 7.1

Punto	Latitud	Longitud
Mareógrafo	34° 33' 42" 7955	58° 23' 57" 3136
Catedral	34° 28' 03" 0531	58° 30' 31" 5129
Bal.Sur Pto.Olivos	35° 04' 25" 6604	58° 28' 59" 9227

El intervalo de latitud y longitud con que se realizaron los dos muestreos fue de 2 minutos. Los medios de apoyo para su realización, una camioneta y un bote neumático con motor fuera de borda, fueron provistos por el Departamento de Hidrografía del Servicio de Hidrografía Naval.

### 7.2.2. Resultados preliminares.

Sobre las muestras de agua superficial colectadas (mas de 200), se realizó el análisis del contenido de metales totales para los elementos Cd, Hg, As, Cr(III) y Cr(VI), Pb, Cu y Zn. Las concentraciones fueron corregidas a través del seguimiento de variabilidad espacial y temporal de un elemento puntero<sup>17</sup>, teniendo en cuenta las características particulares del río (sistema de corrientes, dinámica de mareas, características del sedimento, etc.) lo que permite realizar un **manejo efectivo** de la información obtenida<sup>219</sup>.

Los resultados preliminares mostraron que:

- Las concentraciones de Hg y As no fueron cuantificables con las técnicas analíticas utilizadas (límites de cuantificación 0,5 ng/ml y 5 ng/ml respectivamente) en todas las muestras obtenidas y en ambos muestreos, por lo cual no se continuó su estudio en los monitoreos posteriores. No obstante esto, las técnicas de cuantificación utilizadas presentan bondades suficientes como para asegurar la ausencia de contaminación debida a estos tóxicos, aún para protección de vida acuática, en las zonas objeto del trabajo.



-Las muestras analizadas presentaron concentraciones de Cd total del orden de ppb. Como el nivel admitido por la legislación para protección de la vida ictícola (0,5 ppb)<sup>16</sup> es menor que cualquiera de los valores hallados, se decidió continuar con el análisis de cadmio en los muestreos de monitoreo para conocer su partición y por ende su "biodisponibilidad" porque el análisis de contenido total es meramente "indicativo".

-Cobre y cinc son elementos traza cuyo grado de toxicidad depende de su concentración (no se consideran inherentemente tóxicos), el cobre total presentó niveles bajos, menores que los indicados por la legislación para protección de peces<sup>16</sup> (2 ppm), por lo que no se continuó con el análisis de este metal. Por el contrario el cinc reveló valores altos con lo cual, se decidió estudiar su partición en los muestreos siguientes.

-El análisis de plomo total arrojó resultados altos conforme lo legislado para la protección de la vida en el agua<sup>16</sup> (5 ppb) presentando niveles ligeramente mas altos a medida que nos movíamos aguas abajo del río, por lo que se decidió monitorearlo así como extender la zona de observación de los futuros muestreos mas allá de La Plata.

-Análogamente se estudiaron las concentraciones de Cr(III) total y de Cr(VI) total (refiriéndonos a concentración de cada especie individual en agua+sólidos suspendidos), encontrándose valores muy elevados en algunos puntos para el estado de oxidación III. Los niveles de Cr(VI) no fueron detectables (límite de detección 1 ppb) por lo que su concentración no constituye un peligro en términos de protección de la vida acuática (5 ppb)<sup>16</sup>. Este resultado resulta previsible dado las características reductoras del entorno. Por el contrario, los niveles de Cr(III) totales, resultaron alarmantes, aún en términos de su aptitud para consumo humano (50 ppb)<sup>16</sup> lo que nos decidió a continuar el estudio de partición para conocer la cantidad biodisponible de este elemento. Análogamente

a lo observado en el caso de cromo, los niveles altos de concentración aguas abajo, nos llevaron a extender el estudio hasta mas allá de La Plata.

-Los niveles corregidos de concentración de metales totales en las dos campañas no mostraron diferencias significativas ( $t_{0,05}$ ).

### **7.3. El monitoreo de metales pesados**

#### **7.3.1. Area y características del estudio**

Teniendo en cuenta los resultados preliminares obtenidos en la exploración, se realizaron tres muestreos de aguas superficiales en noviembre de 1993, junio de 1994 y junio de 1995.

En este caso se analizaron Cd, Zn, Pb y Cr, en solución y en sólidos suspendidos, sobre un número mas reducido de muestras. Como en estas ocasiones no se pudo contar con la asistencia del Servicio de Hidrografía se nos dificultó el acceso a distintos puntos por lo cual se seleccionó un solo punto de recolección en cada pierna perpendicular estudiada (100 metros). Se desarrolló entonces, un muestreo de tipo específico con sesgo máximo, encarado en aquellas zonas en las que se encontraron niveles altos de concentración de metales pesados, extendiendo el monitoreo aguas abajo de La Plata.

En paralelo con la recolección de muestras de agua superficial, se realizaron dos muestreos de sedimentos de río en noviembre de 1993 y junio de 1994, utilizando las técnicas de muestreo de sólidos descriptas en el capítulo 6. Se analizaron Pb, Cd, Cr y Zn, previa solubilización de muestras tal como se indica en el capítulo 6.

En junio de 1994 se realizó además un muestreo de plantas emergentes (*Scirpus californicus*), a fin de poder establecer la existencia de acumulación de metales en las distintas partes de las mismas. Se realizaron análisis de Cd, Zn, Pb y Cr en diferentes partes de la planta: tallo, semilla y rizoma, previa solubilización (ver capítulo 6). Los resultados se compararon en relación con los niveles de "background" que presentaron muestras no expuestas, extraídas de puntos no poluídos.

El primer monitoreo de aguas superficiales, diseñado en base a datos preliminares, fue realizado en las siguientes estaciones: San Isidro, Quilmes, Ezpeleta, Hudson, Punta Lara y Punta Blanca. En el segundo muestreo se incorporó la estación Santo Domingo (en el punto en que el canal llega al río) y la estación Berisso y se eliminó la estación Hudson dada la imposibilidad de acceso a ese punto. El tercer muestreo incorporó un nuevo punto denominado Santo Domingo (río) ubicado a 50 metros del lugar donde el canal intersecta al río. Nuevamente no se accedió a la estación Hudson. (Ver localización geográfica de todas las estaciones en la Figura 7.1).

Los muestreos de sedimentos se realizaron en las estaciones: San Isidro, Santo Domingo, Quilmes, Ezpeleta, Hudson, Punta Lara, Berisso y Punta Blanca. En el primer muestreo no se relevaron las estaciones Santo Domingo y Berisso mientras que en el segundo no se pudo muestrear en la estación Hudson.

El análisis en plantas emergentes se realizó en las estaciones de muestreo San Isidro, Santo Domingo, Quilmes, Ezpeleta, Punta Lara, Berisso y Punta Blanca.

### 7.3.2.Resultados

En la Tabla 7.2 a, b y c, se muestran los valores obtenidos para la concentración de metales totales y disueltos en noviembre de 1993, junio de 1994 y junio de 1995, respectivamente. Los concentración de metales en el particulado, obtenida por diferencia ha mostrado excelente concordancia con el análisis directo sobre sólidos suspendidos. No se detectó Cr(VI) en la solución, por lo cual, los valores que se indican deben entenderse como de Cr(III).

**Tabla 7.2a. Muestreo de aguas superficiales, noviembre de 1993**

(Unidad de concentración: ng elemento/ml)

Estación	Cd <sub>total</sub>	Cd <sub>soluc</sub>	Zn <sub>total</sub>	Zn <sub>soluc</sub>	Pb <sub>total</sub>	Pb <sub>soluc</sub>	Cr <sub>total</sub>	Cr <sub>soluc</sub>
San Isidro	<0,2	<0,2	45	44	10	7	<5	<5
Quilmes	<0,2	<0,2	60	60	16	9	9	<5
Ezpeleta	3,0	<0,2	69	68	14	14	9	<5
Hudson	3,0	<0,2	71	60	15	15	10	<5
P.Lara	2,0	<0,2	57	43	14	12	6	<5
P.Blanca	6,0	<0,2	64	41	9	5	5	<5

**Tabla 7.2.b. Muestreo de aguas superficiales, junio 1994**

(Unidad de concentración: ng elemento/ml)

Estación	Cd <sub>total</sub>	Cd <sub>soluc</sub>	Zn <sub>total</sub>	Zn <sub>soluc</sub>	Pb <sub>total</sub>	Pb <sub>soluc</sub>	Cr <sub>total</sub>	Cr <sub>soluc</sub>
San Isidro	4,0	<0,2	48	45	31	23	21	<5
Sto.Dom <sub>desem</sub>	<0,2	<0,2	83	34	10	6	145	58
Quilmes	<0,2	<0,2	64	54	26	16	81	6
Ezpeleta	1,0	<0,2	83	73	33	19	57	6
P.Lara	<0,2	<0,2	43	38	13	9	15	<5
Berisso	<0,2	<0,2	58	45	22	17	17	<5
P.Blanca	2,0	<0,2	40	32	20	16	20	<5

**Tabla 7.2.c. Muestreo de aguas superficiales, junio 1995**  
(Unidad de concentración: ng elemento/ml)

Estación	Cd <sub>total</sub>	Cd <sub>soluc</sub>	Zn <sub>total</sub>	Zn <sub>soluc</sub>	Pb <sub>total</sub>	Pb <sub>soluc</sub>	Cr <sub>total</sub>	Cr <sub>soluc</sub>
San Isidro	<0,2	<0,2	82	82	11	10	170	40
Sto.Dom <sub>desem</sub>	<0,2	<0,2	48	38	5	<5	154	67
Sto.Dom. <sub>rio</sub>	<0,2	<0,2	30	30	9	6	58	11
Quilmes	<0,2	<0,2	41	40	12	10	75	7
Ezpeleta	<0,2	<0,2	48	44	14	10	82	8
P.Lara	<0,2	<0,2	24	23	<5	<5	25	<5
Berisso	<0,2	<0,2	120	98	23	<5	45	<5
P.Blanca	5,0	<0,2	70	70	10	5	65	<5

En la Tabla 7.3 se muestran los niveles de concentración de Cd, Zn, Pb y Cr en sedimentos en los muestreos correspondientes a noviembre de 1993 y junio de 1994, respectivamente.

**Tabla 7.3. Análisis de sedimentos de río**  
Unidad de concentración: mg elemento/kg

Estación	Cadmio		Cinc		Plomo		Cromo	
	Nov.93	junio 94	Nov.93	junio 94	Nov.93	junio 94	Nov.93	junio 94
San Isidro	<0,1	<0,1	215	175	175	165	105	112
Sto.Dom. (rio)	-----	<0,1	-----	210	-----	105	-----	105
Quilmes	<0,1	<0,1	108	125	50	60	78	95
Ezpeleta	<0,1	<0,1	150	115	20	30	68	65
Hudson	<0,1	-----	40	-----	15	-----	35	-----
Punta Lara	<0,1	<0,1	95	85	20	30	50	65
Berisso	-----	<0,1	-----	170	-----	45	-----	68
Punta Blanca	<0,1	<0,1	90	105	40	20	52	60



En la Tabla 7.4 se muestran los niveles de concentración de los metales pesados en diferentes partes de las macrofitas emergentes *Scirpus californicus*.

En cada estación se seleccionaron diez ejemplares maduros, de los que se separaron semilla, tallo y rizoma. Los valores tabulados corresponden a concentraciones promedio, obtenidas conforme el tratamiento y análisis que aparecen descriptos en el capítulo 6.

**Tabla 7.4. Distribución de metales pesados en *Scirpus californicus***  
Unidad de concentración: (mg elemento/kg de muestra seca)

Estación (Parte)	Cd	Zn	Pb	Cr
S.Isidro (Tallo)	0,2	11	<0,1	2,7
S.Isidro (Semilla)	1,2	24	5,9	3,5
S.Isidro (Rizoma)	<0,04	4,0	1,2	0,3
S.Domingo (Tallo)	0,5	4,5	<0,1	6,3
S.Domingo (Semilla)	<0,04	15	<0,1	260
S.Domingo (Rizoma)	<0,04	----	2,1	12
Quilmes (Tallo)	<0,04	4,2	<0,1	1,2
Quilmes (Semilla)	0,7	16	4,1	2,2
Quilmes (Rizoma)	<0,04	-----	<0,1	0,2
Ezpeleta (Tallo)	<0,04	7,3	<0,1	5,5
Ezpeleta (Semilla)	0,5	8,0	4,5	8,6
Ezpeleta (Rizoma)	0,3	12	1,4	4,6
P.Lara (Tallo)	<0,04	6,0	<0,1	2,4
P.Lara (Semilla)	<0,04	16	<0,1	2,2
P.Lara (Rizoma)	<0,04	8,1	<0,1	2,0
Berisso (Tallo)	<0,04	4,8	<0,1	2,3
Berisso (Semilla)	<0,04	35	8,5	2,2
Berisso (Rizoma)	<0,04	3,7	<0,1	0,2
P.Blanca (Tallo)	<0,04	7,8	2,6	9,0
P.Blanca (Semilla)	0,2	15	2,0	5,0
P.Blanca (Rizoma)	0,7	5,4	<0,1	0,4

La Tabla 7.5 muestra los valores de pH, conductividad y temperatura registrados en el curso del río en noviembre de 1993 y junio de 1994, y en la Tabla 7.5 se muestran los valores de los parámetros "físico químicos". (Estos datos se presentan promediados dado que no se observaron diferencias significativas entre muestreos si bien fueron diferentes entre zonas y estaciones (verano e invierno).

**Tabla 7.5.pH, conductividad y temperatura de aguas superficiales**

Muestra/Parámetro	pH		C (μs/cm)		Temperatura (°C)	
	Nov.93	Junio 94	Nov.93	Junio 94	Nov.93	Junio 94
San Isidro	7,27	7,10	500	400	22	13
Santo Domingo (d)	-----	7,95	-----	1040	-----	14
Quilmes	7,95	7,95	470	500	21	15
Ezpeleta	8,10	8,00	500	560	21	15
Hudson	8,00	-----	350	-----	21	----
Punta Lara	7,90	7,60	435	475	20	17
Berisso	-----	7,35	-----	595	-----	15
Punta Blanca	7,80	7,80	540	550	19	13

**Tabla 7.5.Parámetros físico químicos en aguas superficiales (nov.93/junio 94)**  
Unidad de concentración: mg/l

Estación	N-NH <sub>3</sub>	N-NO <sub>3</sub>	N-NO <sub>2</sub>	HCO <sub>3</sub>	SO <sub>4</sub>	Ca	Mg	Cl-	Na	K
S.Isidro	200	150	0,004	190	10	36	9,1	35	48	7,7
S.Dgo (d)*	240	160	0,005	250	10	41	10,3	200	195	----
Quilmes	300	146	0,004	150	18	23	7,0	47	66,4	7,2
Ezpeleta	200	131	0,004	290	20	17	7,5	107	74	7,9
Hudson **	200	133	0,004	110	15	15	7,0	40	55	6,2
Punta Lara	300	153	0,004	107	15	16	7,0	60	60	6,7
P.Blanca	180	340	-----	175	18	18	10	100	100	9,0

\* Solamente en junio de 1994; \*\* solamente en noviembre de 1993

### 7.3.3. Discusión

Antes de discutir los resultados obtenidos, es importante detallar las características de las estaciones de muestreo con el objetivo de realizar una mejor interpretación de los mismos.

Las estaciones ubicadas en San Isidro y Santo Domingo están aguas abajo de la descarga de los ríos Reconquista y Santo Domingo, que reciben a su vez, las descargas del cinturón altamente industrializado de la Provincia de Buenos Aires.

Ezpeleta y Berisso reflejan la influencia de las descargas cloacales de Buenos Aires y La Plata respectivamente, recibiendo los efluentes de millones de personas. Ambos, liberan estos efluentes sin tratamiento previo, directamente en el Río de la Plata.

Los contenidos de metales pesados totales son relativamente constantes a lo largo del tiempo para una misma estación, exceptuando en el caso de cromo que ha mostrado grandes variaciones de tipo temporal. Las concentraciones analíticas muestran diferencias de un orden de magnitud entre el muestreo de verano (noviembre de 1993) y los de invierno (junio de 1994 y 1995) debido, probablemente a descargas discontinuas en el río, en particular a la altura del Santo Domingo (aquí debe tenerse en cuenta que el caudal del Santo Domingo en los dos meses involucrados, noviembre y junio, es aproximadamente constante). Los resultados indicarían que las descargas industriales de cromo parecen ser mayores durante el invierno tal como se puede observar de la comparación de las Tablas 7.2 a, b y c.

Con respecto a la partición de metales entre material suspendido y solución, es evidente que las diferencias del entorno químico entre sitios altera esta relación. Los cambios en la distribución entre invierno y verano pueden deberse a cambios en



la temperatura del agua, dado que, un aumento de la misma, produce movilización de los metales desde el material suspendido hacia la solución. Si se comparan las Tablas 7.2 a, b y c, se puede observar este fenómeno, en particular para Pb, cuyos hidróxidos presentan marcadas diferencias de solubilidad con la temperatura tal como se señala en la bibliografía<sup>203,220</sup>.

En el caso particular del Zn, puede observarse que se encuentra completamente en solución, no observándose variabilidad temporal ni espacial en su partición. El efecto complejante del amoníaco proveniente de la reducción de nitratos, no puede ser el único responsable de la solubilización ya que no se encuentra en gran exceso. Probablemente, los complejos estables que este analito forma con material húmico, sean los responsables de su completa movilización hacia la solución<sup>6,217</sup>.

Respecto de cadmio, debe notarse que, aún en aquellos puntos donde su concentración total resultó mensurable (ver Punta Blanca en cualquiera de los muestreos), los niveles en solución son no detectables, mostrándonos que no podemos hablar de toxicidad con estos resultados de distribución<sup>6</sup>.

El caso de cromo merece una discusión particular. Tal como señaláramos mas arriba, no se encontró Cr(VI) en aguas en ninguna de las estaciones estudiadas y en ninguno de los muestreos, lo cual resulta consistente con las características reductoras del ambiente<sup>221</sup>. (Nótense los contenidos altos de nitrógeno amoniacal). De esta manera, permanece en el particulado debido a las condiciones reductoras del medio y a que el pH no es lo suficientemente bajo como para promover su disolución<sup>222</sup>.

Respecto de la concentración de los metales en los sedimentos del fondo, se puede observar que existe una relación con la cercanía a los principales centros de descarga por un lado y con las características del sedimento por el otro. Sitios como Santo Domingo y San Isidro (ver Tabla 7.3) presentaron los niveles más altos. Por otro parte, en las estaciones lejanas a puntos de contaminación como Punta Blanca, con sedimentos de texturado fino, se encontraron casi los mismos niveles de concentración que los hallados en Punta Lara -una playa arenosa cercana a descargas de contaminantes- mostrándose de esta manera la influencia de la textura sedimentaria en la acumulación de metales.

No se observan diferencias significativas en la variabilidad temporal, lo que es lógico teniendo en cuenta que el análisis de sedimentos da cuenta de contaminación "histórica".

Las concentraciones de metales pesados encontrados en *Scirpus*, resultaron mucho mayores en las zonas mas expuestas a contaminación como San Isidro, Santo Domingo, Berisso y Ezpeleta (ver Tabla 7.4). Zn, Pb y Cd se acumularon principalmente en la inflorescencia, sugiriendo probablemente, una tendencia natural de estas plantas a "autodecontaminarse". El cromo, parece comportarse de idéntica manera en aquellos lugares altamente poluídos como Santo Domingo. Los resultados observados en otras partes de las plantas pueden ser asimilados a "ruido biológico", lo cual puede ser corroborado en la bibliografía<sup>6</sup> donde aparecen tabulados los niveles "normales" en este tipo de macrofitas.

Los contenidos de metales pesados en el tejido de las plantas no se correlacionan con los contenidos metálicos en sedimentos. Este mecanismo fue informado previamente en la bibliografía<sup>223</sup> y asignado a mecanismos de adsorción selectiva que no fueron objetivo del presente estudio

#### 7.3.4. Conclusiones

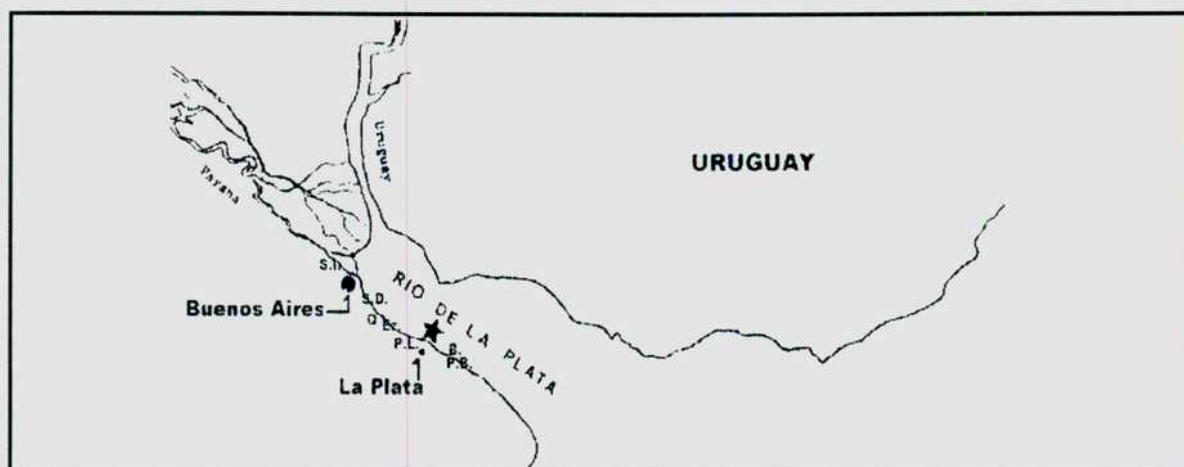
Podemos entonces, concluir que el estuario del Río de la Plata muestra un nivel de contaminación metálica geográficamente variable debido a que existen puntos de descarga de efluentes industriales muy localizados, y que los niveles de concentración total de los metales estudiados son en general mayores que los tabulados para otros estuarios como por ejemplo los de Reino Unido segun informan Langston y Bryan<sup>29</sup>, o los de Italia de acuerdo a Donazzolo y colaboradores<sup>224</sup>, etc.. En el caso de cromo se ha observado además una variación estacional, sugiriendo una mayor actividad de la industria curtidora durante el invierno. Tambien podemos decir que la distribución de los metales entre sólidos suspendidos y solución es variable, dependiendo del metal y de las características físico químicas del ambiente.

La metodología analítica que hemos desarrollado en ocasión de este estudio nos ha permitido, en definitiva, "seguir" la concentración de metales en términos de tiempo, espacio y partición, con límites de cuantificación que permiten establecer el grado de calidad de las aguas en términos de protección de cualquier forma de vida.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es que, mas allá de que los niveles de concentración de algunos metales en solución no se consideren "riesgosos" hoy en día, la metodología analítica que optimiza límite de detección y sensibilidad puede estudiar la "evolución" de la contaminación en un medio acuático particular y realizar diagnóstico temprano.

Nos restaría trabajar mas extensamente en las técnicas de especiación de metales libres y organoligados (en particular a material húmico), en línea y en niveles bajísimos de concentración para poder hacer un "ajuste fino" en términos de biodisponibilidad de metales.

**Figura 7.1**  
**Localización geográfica de estaciones de muestreo específico: Zona costera del Río de la Plata**



S.I: San Isidro, S.D.:Santo Domingo, Q.:Quilmes; Ez.:Ezpeleta; P.L.: Punta Lara; B.:Berisso;  
P.B.:Punta Blanca.

**APENDICES**

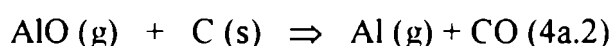
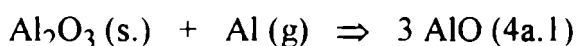
## Apéndice del capítulo 4

### 4a.1. Mecanismos de atomización: Teorías recientes. Aspectos cinéticos y termodinámicos

Con el objeto de mostrar las últimas teorías relacionadas con los mecanismos de atomización en el horno de grafito, y en la necesidad de señalar que la discusión respecto de lo que ocurre en el interior del horno sigue abierta, exponemos aquí una serie de trabajos que muestran los últimos desarrollos sobre el tema.

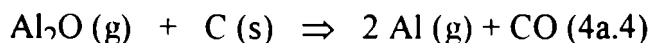
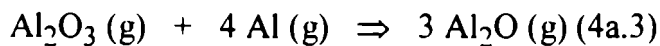
L'vov<sup>225</sup> teoriza sobre la atomización del aluminio aceptando que la formación de átomos de este elemento se produce una vez que todas las especies que lo contienen dan lugar a la formación de alúmina. La discusión, se produce cuando se intenta ver de que manera la alúmina se reduce por carbón cuando la temperatura se incrementa.

Se ha demostrado que la alúmina pierde peso rápidamente cuando está suspendida en grafito proponiéndose el siguiente mecanismo autocatalítico:



El AlO(g) formado durante el proceso de vaporización a partir de la alúmina alcanza la superficie del grafito para ser reducido a Al de acuerdo a la reacción (4a.2). El Al (gas) llega a contactarse con Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y tiene lugar la reacción (4a.1) con formación de 3 AlO (g), con lo cual, en cada ciclo se triplica la cantidad de aluminio formada.

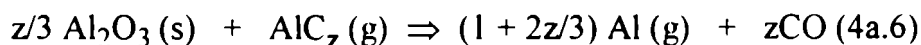
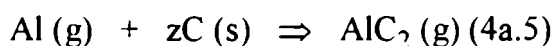
Obviamente, se han propuesto mecanismos de reacción alternativos:



Las consideraciones de equilibrio indican que al aumentar la presión parcial de Al, la presión parcial de  $\text{Al}_2\text{O}$  aumenta más rápidamente que la de  $\text{AlO}$  y las reacciones (4a.3) y (4a.4) predominan.

L'vov<sup>226</sup> observó la aparición de picos pequeños y agudos (spikes) para Al en absorción atómica con horno de grafito (ETA-AAS) cuando el horno era calentado lentamente y se vaporizaban masas grandes (del orden del microgramo) de muestra. Planteó entonces, que la rápida formación de Al durante la aparición de estas señales se debía a una reacción autocatalítica que comprendía la formación de un carburo de aluminio gaseoso con posterior reducción del óxido por este carburo, con lo que desarrolla su teoría del ROC (reducción de óxidos por carburo), la que sigue siendo debatida hoy en día entre los especialistas.

La teoría del ROC está basada en las siguientes ecuaciones:



Se discute la factibilidad de este proceso en términos de las probabilidades de que los reactivos gaseosos lleguen a sus contrapartes sólidas y de que ocurra la reacción luego de producido el encuentro, lo que puede ser manejado modificando la geometría del horno.

En la bibliografía<sup>103,104</sup> se trata de explicar la señal de spike observada en hornos de tipo Massmann tomando en cuenta el transporte de energía y las diferencias de temperatura entre la muestra y el horno ó dentro de diferentes zonas de la muestra. Se considera que dado el enfriamiento operado sobre las partículas de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  durante la formación de spikes, los carburos gaseosos se descomponen y el carbono así producido produce una capa delgada sobre la superficie de los óxidos impidiendo su posterior reducción y haciendo desaparecer esta señal. Este depósito se pierde luego por oxidación con la subsecuente reiniciación del proceso autocatalítico.

El atomizador de tipo Massmann (que se utiliza en nuestro estudio), posee un marcado gradiente de temperaturas a lo largo del eje del tubo que puede afectar la formación de spikes por adsorción-desorción ó por evaporación-condensación de los reactivos gaseosos.

Por otra parte<sup>227</sup>, se ha demostrado que la presencia de agua juega un papel importante en la formación de spikes al comparar la extensión de este proceso en muestras suspendidas en agua ó en ciclohexano, sin haberse determinado aún el mecanismo que produce este efecto. De todos modos, y como decíamos antes, aún no se ha presentado evidencia detallada de como procede la reacción de atomización.

Para explicar la cinética y la termodinámica de los procesos de atomización en ETA-AAS se han propuesto dos modelos que explican la mecánica de transporte del analito a través del horno: procesos de adsorción-desorción y de condensación-evaporación.



El primero asume que el analito forma, en el momento de entrar en la fase gaseosa dentro del horno, una monocapa que se distribuye uniformemente sobre la superficie del horno, o bien que se distribuye en forma de átomos ó moléculas individuales pegadas a la superficie del horno por sorción química ó física.

El segundo concepto establece que la muestra se encuentra distribuida en forma de microgotas ó microcristales con características termoquímicas propias de estas sustancias.

Las evidencias a favor de la primer teoría son:

- El "tailing" de las señales que se atribuye a repetidos procesos de adsorción-desorción dentro del horno.

- La baja energía de activación para la liberación de los átomos metálicos en comparación con las energías de vaporización correspondientes.

L'vov<sup>228</sup>, que se opone a los a los argumentos de esta teoría, llevó a cabo una serie de experiencias en las que utilizó un tubo de grafito y una plataforma de grafito, vaporizando la muestra desde el tubo con y sin la plataforma adicional y desde la plataforma directamente, observando en todos los casos picos con la misma forma lo que lo condujo a reafirmar su oposición a la teoría de adsorción-desorción.

Por otra parte, utilizando un tubo de grafito con recubrimiento de Ta ó sin el, el valor de absorbancias medido fue igual (dentro del error experimental), con lo que se desestimó la responsabilidad del proceso de adsorción-desorción en el "tailing de las señales".

Con respecto a las consideraciones para la energía de activación, se ha medido para Cu<sup>229</sup> una energía de 35kcal/mol que resulta ser menor que la del oro

por ejemplo, que tiene un valor de 80-85 kcal/mol<sup>230</sup>. Sin embargo para condiciones idénticas de reacción, el pico de cobre resulta mucho mas ancho que el de oro lo que indica una mayor dificultad para la liberación de este metal desde la superficie del grafito. Esto podría explicarse planteando para el cobre un proceso de recubrimiento de las partículas por un film de C, similar al del caso del aluminio, por lo cual la energía de activación medida en estas condiciones representaría en realidad una combinación de todos estos procesos y no tendría un significado físico definido. Por otra parte, si tal fuera la energía de activación del proceso, cabría esperar que la atomización procediera a una temperatura mucho menor que la evaporación tradicional.

#### **4a.2. Mecanismos posibles de acción de los modificadores de matriz**

Una de las aplicaciones mas importantes en ETA-AAS es el análisis de elementos traza en aguas, con lo cual una de las interferencias mas estudiadas es la de cloruros.

Existe un consenso general respecto del mecanismo por el cual opera esta interferencia: formación de cloruros volátiles del analito que ocasiona su pérdida y/o recuperación incompleta. Lo que queda por esclarecer es el momento y el lugar físico en el cual se produce la formación del haluro: ¿es en la fase condensada durante el proceso de pirólisis ó en la fase gaseosa en el período de atomización?.

Tomemos como ejemplo la determinación de Tl en presencia de grandes cantidades de cloruro y tratemos de ver el tipo y extensión de la interferencia y la acción del/los modificadores de matriz.

L'vov<sup>231</sup> atribuye la interferencia a la entalpía de disociación del  $\text{TlCl}$ . Soportó esta teoría diciendo que la interferencia puede ser disminuída por la

adición de sales de litio que al formar un haluro mas estable, impide la formación del de Tl. Para responder a la pregunta sobre el momento y escenario de la formación del cloruro interferente, Welz<sup>187</sup> utilizó una plataforma de atomización de doble cavidad con intención de separar al analito de la interferencia y no obtuvo disminución de la señal de Pb por formación de  $\text{PbCl}_2$ , de lo que surgió la idea de que la reacción se producía en fase condensada. Para Tl, encontró evidencia de la formación del haluro en ambas fases.

Otro mecanismo propuesto<sup>232</sup> sugiere la expulsión del analito durante la etapa de atomización; en este caso el exceso de interferente sufriría una descomposición rápida y violenta que desplazaría físicamente al analito, arrastrándolo consigo fuera del horno.

El Tl puede ser determinado en ausencia de cloruros a una temperatura de pirólisis de 700° C sin pérdida por volatilización pero, en presencia de cloruros no se recupera a esa temperatura. Evidentemente la cercanía entre la temperatura de volatilización del  $\text{TlCl}$  (720° C) y la de pirólisis provoca esta pérdida. El cloruro, además de interferir químicamente, produce una interferencia espectral que puede ser anulada si la señal de fondo no excede la capacidad de corrección del equipo (100  $\mu\text{g}$  de  $\text{NaCl}$  para corrección por lámpara de deuterio). En caso contrario, se puede adicionar una sal de Pd que retarda, respecto de la señal de  $\text{NaCl}$ , la aparición del pico específico de Tl.

Otra pregunta importante es el momento en que debe adicionarse el modificador de matriz. Cuando el modificador de Pd se mezcla con la muestra, previo al análisis, la solución pipeteada en el horno contiene  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Tl}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  y  $\text{NO}_3^-$ . Al secarse, la formación de cristales de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  y de  $\text{PdCl}_2$  puede estar

acompañada de la co-cristalización de  $\text{TlNO}_3$  y  $\text{TlCl}$ , ó puede ser que el Tl aparezca incorporado dentro de las redes cristalinas de las sales de Pd (no olvidemos que Tl es el componente menor). De esta manera, el Tl estaría embebido en las sales de Pd y durante la pirólisis se estabilizaría al embeberse en Pd fundido. Pero, en estas condiciones puede ser que el Tl se embeba parcialmente en las sales de Na y así al no hallarse en contacto íntimo con el Pd, esta fracción no resulte estabilizada.

La estabilización de Tl por Pd demostró ser mucho mas efectiva cuando éste se prepiroliza a  $900^\circ\text{C}$  antes de agregar la muestra. Este comportamiento fue explicado por Welz<sup>233</sup> quien sugirió que luego de la pre-pirólisis el Pd forma un depósito en la superficie del grafito. Al introducir la muestra, el Tl se deposita en la superficie activa del Pd. Luego del secado, la superficie de Pd presenta una submonocapa de Tl cubierta de  $\text{NaCl}$  y  $\text{NaNO}_3$  y, en este contexto, cualquier pérdida de Tl ocurre durante la atomización y no durante la pirólisis. Este hecho garantiza la independencia del porcentaje de recuperación y la temperatura de "ash" que puede ser elevada hasta  $800^\circ\text{C}$  (la unión Pd-Tl es lo suficientemente fuerte como para permitir su estabilización a esta temperatura). Aunque el  $\text{NaNO}_3$  se descompone a  $380^\circ\text{C}$ , el  $\text{NaCl}$  es estable hasta 800 con lo cual hasta temperaturas de  $900^\circ\text{C}$  no se pierde por completo lo que hace que se volatilice en la etapa de atomización ó "atomize" y arrastre al analito fuera del horno. La porción de Tl adsorbido en Pd que no ha podido embeberse suficientemente en el, se expelle. A una temperatura de pirólisis mayor que  $900^\circ\text{C}$ , el cloruro se pierde y no hay suficiente cantidad de  $\text{NaCl}$  en el horno como para coexpeler el Tl durante la atomización. En estas circunstancias, la atomización procede con la liberación del Tl desde el Pd fundido por difusión.

El agregado de Mg al modificador proporciona una estabilización adicional según observa Jackson<sup>234</sup>. Se propone la formación de una capa de MgO en la superficie del horno la que actúa como sustrato para Pd y le permite una distribución mas pareja en la superficie del grafito. El analito difunde más rápidamente a través de las gotas de Pd mas pequeñas que se han formado. Para finalizar, es importante la concentración del/los modificadores. Jackson propone 20  $\mu\text{g}$  de Pd + 10  $\mu\text{g}$  de Mg para estabilizar 1 ng de Tl en presencia de hasta 200  $\mu\text{g}$  de NaCl.

Los ejemplos de mecanismos de atomización en hornos de grafito y de mecanismos de acción de los modificadores de matriz se han incluido en este apéndice con dos objetivos: aclarar las "vías" a través de las cuales se diseñaron las experiencias de cuantificación de los metales pesados estudiados y fundamentar los posibles mecanismos de acción que proponemos para los modificadores utilizados en el capítulo 6. Obviamente, estos no han si bien, esta justificación no constituye "per se" el objetivo del estudio.

## Apéndice del Capítulo 6

### 6a.1. Nómina y características de los reactivos y aparatos utilizados en el estudio.

#### i) Reactivos

- HCl (c).
- HNO<sub>3</sub> (c).
- HF (c)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (c)
- HCOO-CH<sub>3</sub> (c)
- NH<sub>3</sub> (c)
- NaOH (sól.)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 vol.)
- NaBH<sub>4</sub> 2,5 % p/v en NaOH 0.5 % p/v
- SnCl<sub>2</sub> 20 % p/v en HCl 1+1 v/v.
- NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10.000 g P/litro
- Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 10.000 g Mg/litro
- Pd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 10.000 g Pd/litro
- Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> 10.000 g W/litro
- 1,5-difenilcarbocida (sól.)
- sílice lavada en ácido nítrico
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (sól.)
- Sal disódica del etilendiamino tetraacético (Titriplex I Merck Química. sól.)
- Acido sulfanílico (sól.)
- alfa-naftilamina (sól.)
- Chelex 100 (iminodiacetato comercial, 200 mesh)
- KI (sólido)
- Soluciones patrón de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1.000 g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/litro

-Soluciones patrón de  $\text{NO}_2^-$ , 1.000 g  $\text{NO}_2^-$ /litro

- Soluciones patrón Titrisol Merck de:

Arsénico 1,000 g As(v)/litro.

Cadmio 1,000 g Cd(II)/litro.

Cobre 1,000 g Cu(II)/litro.

Cromo 1,000 g Cr(VI)/litro.

Mercurio 1,000 g Hg(II)/litro.

Plomo 1,000 g Pb(II)/litro.

Todos los ácidos, bases y reactivos sólidos utilizados son de calidad para análisis ó Suprapur Merck en los casos en que se consideró necesario.

Todas las soluciones preparadas a partir de los sólidos, así como las diluciones para la preparación de estándares de calibración, fueron realizadas con agua de baja conductividad (18 M $\Omega$ ) de un equipo deionizador de agua alimentado con agua previamente deionizada.

## ii) Aparatos

-Espectrómetro de absorción atómica Shimadzu AA 6501, con accesorio para atomización electrotérmica Shimadzu GFA 6000 y automuestreador ACS 6000.

-Espectrómetro de absorción atómica Varian AA 5 acoplado a un registrador-integrador Varian 4290.

-Generador de vapor de vidrio acoplado a una celda de cuarzo, diseñado en el laboratorio. Ver Figura 6a.1.

-Espectrofotómetro Uv-visible Carl Zeiss DMR 11. Se utilizó con una celda de flujo Carl Zeiss de cuarzo de 1,00 cm de paso óptico y 80  $\mu\text{l}$  de capacidad.

-Digestor de microondas cerrado Prolabo Superdigest con recipiente de cuarzo, capacidad 80 ml.

- Digestor de microondas semicerrado Prolabo Maxidigest 301 con recipientes de cuarzo y/o teflón: capacidad útil 50 ml.
- pHmetros-conductímetros para trabajo e campo.
- Sistema deionizador de agua MilliQ.
- Titulador automático Crison MicroTT 2050.
- Bomba peristáltica de cuatro canales y velocidades de flujo variables (0,05-10 ml/min) Ismatec MS Reglo.
- Inyector manual de acrílico doble proporcional, realizado en nuestros laboratorios según describieran Giné et al.<sup>122</sup>.
- Confluencias de acrílico para el armado de los distintos sistemas FIA.
- Válvulas solenoides para inyección automática Cole-Parmer.
- Tubería de polietileno (id=0,75 mm) para construcción de reactores, "loops" de muestras, etc. en el diagrama FIA.
- Microcolumnas empacadas para uso como microreactores FIA según se describirá en la etapa de procedimientos.
- Sacabocados de plexiglass (d=4,5 cm)
- Filtros de membrana (0,45  $\mu$ )
- Filtros Whatman GF/C.

#### **6a.2.Detalle de la preparación de soluciones para la determinación simultánea de nitratos y nitritos.**

Se utilizó como solución transportadora (carrier) una solución reguladora concentrada preparada a partir de 68,1 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 26,8 g de NaOH y 38,2 g de Titriplex I disueltos en un litro de agua de baja conductividad. En las experiencias se realizaron diluciones 1:5 ajustadas a pH=8 obteniéndose un regulador de concentración final 0,1 M.



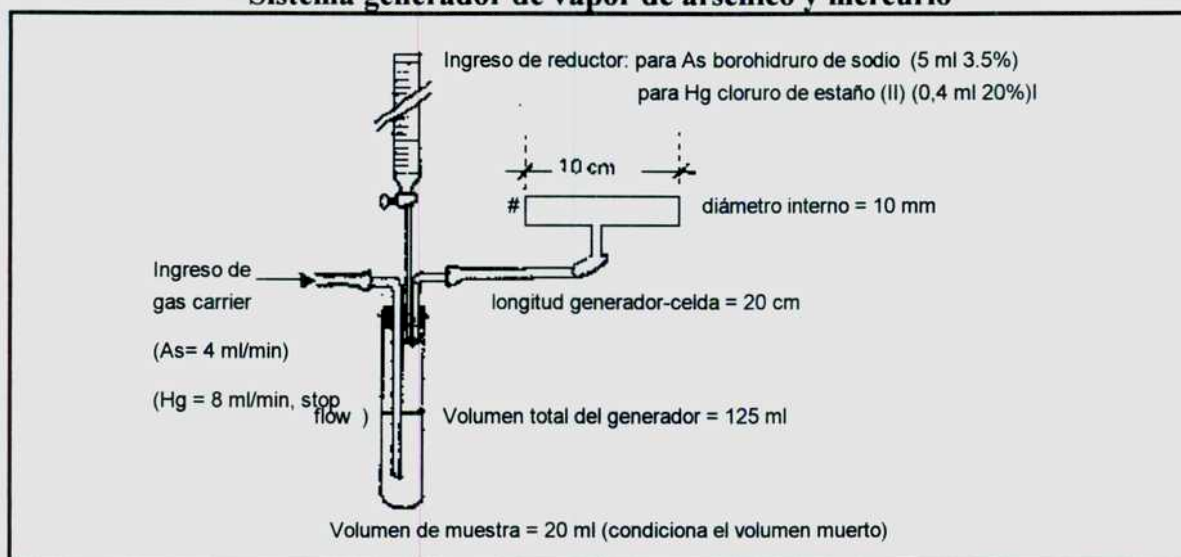
El reactivo colorimétrico se preparó a partir de 2 g de ácido sulfanílico y 2 g de  $\alpha$ -naftilamina en acético 20% llevado finalmente a 500 ml con agua. Las soluciones, de una semana de duración como máximo, se almacenaron a 4° C.

Las columnas de reducción se empacaron con limaduras de Cd (200 mesh) o bien con cadmio cobreado al que se preparaba diariamente según se indica en la bibliografía<sup>235</sup>.

Los patrones de trabajo de nitrato y nitrito fueron preparados por adecuada dilución de las soluciones "madre" en solución de transporte (buffer de pH=8).

Las muestras de agua filtradas fueron acondicionadas con la misma solución buffer.

**Figura 6a.1**  
**Sistema generador de vapor de arsénico y mercurio**



# El sistema es completamente abierto, no hay ventanas de cuarzo en el camino óptico de la lámpara de cátodo hueco.

# **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup>Jerome Williams, *Introduction to Marine Pollution*, J.Wiley & Sons, New York, (1979)
- <sup>2</sup>Envitec Dusseldorf: *Technology of Environmental Protection*, Environmental Information Center from Dusseldorf, (1992).
- <sup>3</sup>E.T. Mariscotti, *Glosario sobre Ecología y Medio Ambiente*, (1993).
- <sup>4</sup>J.E. Fergusson, *The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, Pergamon Press, (1990).
- <sup>5</sup>T.Lynch, N.Kernoghan and J.Wilson, *Analyst*, **109**, 839 (1984).
- <sup>6</sup>I.Bodek, *Environmental Inorganic Chemistry*, Pergamon Press, (1988).
- <sup>7</sup>D. Behne, *Analyst*, **117**, 555 (1992).
- <sup>8</sup>L.H.Keith, *Environmental Sampling and Analysis*, Lewis Publishers, USA, (1991).
- <sup>9</sup>L.T.Bone, in *Principles of Environmental Sampling*, L.H.Keith ed., ACS, (1988).
- <sup>10</sup>M.J.Barcelona, in *Principles of Environmental Sampling*, L.H.Keith ed., ACS, (1988).
- <sup>11</sup>L.H.Keith, W.Crummett, J.Deegan Jr., R.A. Libby, J.K.Taylor and G.Wentler, *Anal.Chem.* **55**, 2210 (1983).
- <sup>12</sup>ACS Committe on Environmental Improvement, *Anal. Chem.*, **52**, 2242 (1980).
- <sup>13</sup>L.H.Keith, *ES&T*, **24(5)**, 610 (1990).
- <sup>14</sup>EPA, *Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*, (1986).
- <sup>15</sup>J.K.Taylor, in *Principles of Environmental Sampling*, L.H.Keith ed., ACS, Washington DC, (1988).
- <sup>16</sup>*Ley Nacional de Residuos Peligrosos 24051, Anexo 2*, (1993).
- <sup>17</sup>Comisión Administradora del Río de la Plata, SHN-SOHMA, *Estudio para la evaluación de la contaminación en el Río de la Plata*, vol. I y II, (1989).

- <sup>18</sup>M.P.Maskarinec, C.K.Bayne, L.Johnson, S.Holladay y R.A.Jenkins, *ES&T*, **24**, 1665 (1989).
- <sup>19</sup>J. Maslowska, *Spektrom.At.Emisyjnej.Absorp. Spektrocm.*, **120**, 160 (1983).
- <sup>20</sup>A.D.Schwope y D.E.Till, *Dtsch.Labensm.Runsch.*, **82(9)**, 277 (1986).
- <sup>21</sup>M.Solame, *Polymer Science Technology (England)*, **6**, 245 (1974).
- <sup>22</sup>R.C.Austin, *Modern Plastics Encyclopedia*, **62**, 44 (1986).
- <sup>23</sup>A.Tessier y P.G.C. Campbell, *Hydrobiologia*, **149**, 43 (1987).
- <sup>24</sup>L.Lion, R.S.Altmann y J.O. Leckie, *ES&T*, **16**, 660 (1982).
- <sup>25</sup>F.Burriel Martí, F.Lucena Conde, S.Arribas Jimeno y J.Hernández Mendez, *Química Analítica Cualitativa*, 13.edición, Ed.Paraninfo, Madrid, (1989).
- <sup>26</sup>Inland Waters Directorate-Water Quality Branch, *Analytical Methods Manual*, Ottawa, Canada, (1979).
- <sup>27</sup>A.Kohler, *Mar.Environ.Res.*,**28**, 417 (1989).
- <sup>28</sup>G.W.Bryan y L.G.Hummerstone. *J. Mar. Biol. Ass. (UK)*, **57**, 75 (1977).
- <sup>29</sup>G.W.Bryan y W.J. Langston, *Environ.Pollut.*, **76**, 89 (1992)
- <sup>30</sup>A. Abu-Samra, J.Morris y S.R.Koirtyohann, *Anal.Chem.*, **47**, 1475 (1975).
- <sup>31</sup>E.Jackwerth y S.Gomiseck, *Pure Appl.Chem.*, **56(4)** , 480 (1984).
- <sup>32</sup>E.D.Neas y M.J.Collins in *Introduction to Microwave Sampling Preparation*, H.Kingston & L.Jassie ed., ACS, (1988).
- <sup>33</sup>R.A.Nadkarni, *Anal.Chem.*,**56**, 2233 (1984).
- <sup>34</sup>F.Smith, B.Cousins, *Anal.Chim.Acta*, **177**, 243 (1985).
- <sup>35</sup>L.Fischer, *Anal.Chem.*, **58**, 261 (1986).
- <sup>36</sup>S.Nakashima, R.Sturgeon, S.Willie y S.Berman, *Analyst*, **113**, 159 (1988).
- <sup>37</sup>H.Kingston y L.Jassie, *Anal.Chem.*, **58**, 2534 (1986).
- <sup>38</sup>A.Vrána y E.Petrzelová, Pittsburgh Conference, Chicago, USA, (1994).
- <sup>39</sup>R.Thomas White,Jr., in *Introduction to Microwave Sampling Preparation*, H.Kingston & L.Jassie ed., ACS, (1988).

- <sup>40</sup>P.Torres, J.A.García Mesa y M.D.Luque de Castro, *Fres.J.Anal.Chem.*, **346**, 704 (1993).
- <sup>41</sup>L.W.Collins, E.M.L.Lorentzen y H.M.Kingston, *Pittsburgh Conference*, Chicago, USA, (1994).
- <sup>42</sup>K.Y.Patterson, C.Veillon y H.Kingston in *Introduction to Microwave Sampling Preparation*, H.Kingston & L.Jassie ed., ACS, (1988).
- <sup>43</sup>R.A.Nadkarni, *Anal.Chem.*, **63**, 675 (1991).
- <sup>44</sup>B.King in *Quality Assurance for Analytical Laboratories*, ed. M.Parkany, RSC, Cambridge, (1994).
- <sup>45</sup>M.Valcarcel y A.Ríos, *Trends Anal.Chem.*, **13**, 17 (1994).
- <sup>46</sup>S.M.Anderson y J.Ngeh-Nagwainbi in *Quality Assurance for Analytical Laboratories*, ed. M.Parkany, RSC, Cambridge, (1994).
- <sup>47</sup>J.N.Miller y J.N.Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd.Ed., Ellis Horwood Chichester, (1988).
- <sup>48</sup>L.Davies, *Efficiency in Research, Development and Production*, Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, (1993).
- <sup>49</sup>Notas Breves, *Trends Anal.Chem.*, **9**(6), VII (1990),
- <sup>50</sup>R.W.Dabeka y S. Hayward in *Quality Assurance for Analytical Laboratories*, ed. M.Parkany, RSC, Cambridge, (1994).
- <sup>51</sup>M.Hoenig, *Analisis*, **20**, 52 (1993).
- <sup>52</sup>J.K.Taylor, *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, **69**, 398 (1986).
- <sup>53</sup>National Institute of Standards and Technology (NIST), *Publicación Especial* 829, (1992),
- <sup>54</sup>M.Valcarcel y A.Rios, *Anal. Chem.*, **65**, 781A (1993).
- <sup>55</sup>S. Berman, R.E. Sturgeon, J.A.H. Desaulniers y A.P. Mykytiuk, *Mar. Poll. Bull.*, **14**(2), 69 (1983).

- <sup>56</sup>W.H.Beyer, *Handbook of Tables for Probability and Statistics*, 2nd.Ed., CRC Press, Boca Raton, (1968).
- <sup>57</sup>G.P.Box, W.G.Hunter y J.Stuart Hunter, *Statistics for Experimenters, An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*, J.Wiley, New York, (1978).
- <sup>58</sup>F.Rius, *Curso sobre aseguramiento de calidad en laboratorios químicos*, Univ.Nac.del Sur, (1995).
- <sup>59</sup>H.Willard, L.Merritt, J.Dean y F.Settle Jr., *Instrumental Methods of Analysis*, 7a.ed., Wadsworth Inc., USA, (1988).
- <sup>60</sup>S.Borman, *Anal.Chem.*,**57(9)**, 983A (1985).
- <sup>61</sup>E.Sentimenti y G.Mazzetto en *Applicazione dell' ETA-AAS Zeeman nell laboratorio tossicologico*, Ed.: S.Caroli y C.Minoia, Libreria Cortina, Padova (1989).
- <sup>62</sup>Z.Alfassi, *Activation Analysis*, Ed.Pergamon Press, (1990).
- <sup>63</sup>B.Sansoni, *Instrumentelle Multielementanalyse*. Ed. Springer Verlag, Alemania, (1985).
- <sup>64</sup>O.A. Shpigun y Y.A. Zolotov, *Ionic Chromatography in Water Analysis*, Ed. E.Horwood Ltd., Chichester, (1988).
- <sup>65</sup>P.E. Jackson y P.H. Haddad, *J.Chromatog.*,**346**, 125 (1985).
- <sup>66</sup>O.A. Shpigun y Y.A. Zolotov, *Zh.Analit.Khim.*, **42**, 1209 (1987).
- <sup>67</sup>R.Barnes, *Developments in Atomic Plasma Spectrochemical Analysis*, Ed.J.Wiley & Sons, New York, (1981).
- <sup>68</sup>W.T.Elwell & J.F.Gidley, *Atomic Absorption Spectrophotometry*, 2a. Edición, Pergamon Press, Londres (1966).
- <sup>69</sup>J.Ramirez Muñoz, *Atomic Absorption Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam (1968).

- <sup>70</sup>G.F.Kirkbright y M.Sargent, *Atomic Absorption and Fluorescence Spectroscopy*, Academic Press, Londres, (1977).
- <sup>71</sup>P.T.Gilbert, *Anal.Chem.*, **34**, 210R (1962).
- <sup>72</sup>W.Slavin, *Appl.Spectr.*, **20**, 281 (1966).
- <sup>73</sup>A.Walsh, *Spectrochim. Acta*, **7**, 108 (1955).
- <sup>74</sup>A.G.Gaydon y H.G.Wolfhard, *Flames, Their Structure, Radiation and Temperature*, 3er. edición, Chapman & Hall, Londres, (1970).
- <sup>75</sup>J.B.Willis, *Nature*, **207**, 715 (1965).
- <sup>76</sup>J.B.Willis, *Spectrochim. Acta*, **23A**, 811 (1967).
- <sup>77</sup>C.D.West y D.N.Hume, *Anal.Chem.*, **36**, 412 (1964).
- <sup>78</sup>W.J.Kirsten y G.Bertilson, *Anal.Chem.*, **38**, 648 (1966).
- <sup>79</sup>H.Kahn, G.Peterson y J.E.Schallis, *Atomic Absorption Newsletter*, **7**, 35 (1968).
- <sup>80</sup>P.J.Zeegers, N.Townsend y J.Winefordner, *Spectrochim. Acta*, **24B**, 243 (1969).
- <sup>81</sup>L.de Galán y G.F.Samaey, *Spectrochim. Acta*, **25B**, 245 (1970).
- <sup>82</sup>G.F.Kirkbright y L.Ranson, *Anal Chem.*, **43**, 1238, (1971).
- <sup>83</sup>B.V.L'vov, *J.Eng.Phys.*, **2(2)**, 44 (1959).
- <sup>84</sup>S.P.Choong y W.Loong Seng, *Nature*, **204**, 276 (1964).
- <sup>85</sup>H.Massman, *Spectrochim. Acta*, **23B**, 215 (1968).
- <sup>86</sup>R.Woodriff y G.Ramelow, *Spectrochim. Acta*, **23B**, 665 (1968).
- <sup>87</sup>T.S.West y X.R.Williams, *Anal.Chim.Acta*, **45**, 27 (1969).
- <sup>88</sup>L.Hatch y E.Ott, *Anal.Chem.*, **40**, 2085 (1968).
- <sup>89</sup>K.C. Thompson y D.R.Thomerson, *Analyst*, London, **99**, 595 (1974).
- <sup>90</sup>P.K.Hon, O.W.Lau, W.Cheung y M.Wong, *Anal.Chim.Acta*, **11**, 355 (1980).
- <sup>91</sup>A.Walsh, *Spectrochim. Acta*, **35B**, 643, (1980).
- <sup>92</sup>B.V.L'vov, *Spectrochim. Acta*, **17**, 761 (1961).
- <sup>93</sup>B.V.L'vov, *Spectrochim.Acta*, **24B**, 53 (1969).
- <sup>94</sup>G. F .Kirkbright y R. N. Snook, *Anal. Chem.* **51**, 1938 (1979).



- <sup>95</sup>B.L'vov y G.N.Ryabchuk, *Spectrochim. Acta*, **37B**, 673 (1982).
- <sup>96</sup>B.V.L'vov, *Spectrochim. Acta*, **33B**, 153 (1977).
- <sup>97</sup>B.V.L'vov, *Pure and Applied Chemistry*, **23**, 11 (1970).
- <sup>98</sup>B.L'vov, L.Pelieva y A.Sharnapolski, *Zh.Prikl.Spektrosk., Rusia*, **27**, 395 (1979), en ruso.
- <sup>99</sup>W.Slavin y G.Carnrick, *At.Spectrosc.*, **6**, 157 (1985).
- <sup>100</sup>C.Chakrabarti, S.Wu, R.Karkowska, J.Rogers, P.Bertels y R.Dick, *Spectrochim. Acta*, **39B**, 415 (1984).
- <sup>101</sup>R.D. Ediger, G. Peterson y J. Kerber, *At. Absorpt. Newsl.*, **13**, 61 (1974).
- <sup>102</sup>R.D. Ediger, *At.Abs.Newsletter*, **14**, 127 (1976).
- <sup>103</sup>W. Slavin y D.C.Manning, *Anal.Chim.Acta*, **117**, 267 (1980).
- <sup>104</sup>H. G. Human, N.P.Ferreira, C.J.Rademeyer y P.K.Faure, *Spectrochim.Acta*, **37B**, 593 (1982).
- <sup>105</sup>B.V.L'vov, P.Bayunov y G.Ryabchuk, *Spectrochim. Acta*, **36B**, 397 (1981)).
- <sup>106</sup>K.Jackson y T.Mahmood, *Anal.Chem.*, **66**, 252R (1994).
- <sup>107</sup>W.Robbins y J.Caruso, *Anal.Chem.*, **51**, 889A (1979).
- <sup>108</sup>G.Schnitzer, A.Soubelet, C.Testu y C.Vastel, in *Handbook on the toxicology of metals*, ed. Lars Friberg, Elsevier (1986).
- <sup>109</sup>D.D.Siemer, P.Koteel y V.Jariwala, *Anal.Chem.*, **48(6)**, 836 (1978).
- <sup>110</sup>W.O. McReynolds, *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 685 (1970).
- <sup>111</sup>O.Clinton, *Analyst*, **102**, 187 (1977).
- <sup>112</sup>S.Peats, *At.Absorpt.Newsl.*, **18(6)**, 118 (1979).
- <sup>113</sup>O.Oster y W.Prellwitz, *Clin.Chim.Acta*, **124**, 277 (1982).
- <sup>114</sup>R.L.Pecsok, L.D.Shields T.Cairns y I.G.McWilliam, *Modern Methods of Chemical Analysis*, Wiley, New York (1976).
- <sup>115</sup>G.W.Ewing, *Instrumental Methods of Chemical Analysis*, 4a. Edición, MacGraw Hill, (1985).

- 116G.D.Christian y J. O'Reilly, *Instrumental Analysis*, Allyn & Bacon, Boston (1986).
- 117J.Ruzicka y E.H.Hansen, *Anal. Chim. Acta*, **99**, 37 (1978).
- 118L.T.Skeggs, *Anal. Chem.*, **38**, 31A (1966).
- 119J.Ruzicka y E.Hansen, *Anal. Chim. Acta*, **78**, 145 (1975).
- 120J.Ruzicka y J.W.B.Stewart, *Anal. Chim. Acta*, **79**, 79 (1975).
- 121J.F.Tyson, *Anal. Proc.* **18**, 542 (1981).
- 122Z.Fang, J.Harris, J.Ruzicka y E.Hansen, *Anal. Chem.*, **57**, 1457 (1985).
- 123M.F.Giné, F.J.Krug, H.Bergamin F<sup>o</sup>, E.A.G.Zagatto y B.F.Reis, *Anal. Chim. Acta* **114**, 191 (1980))
- 124E.A. Zagatto, A.O. Jacintho, F.J. Krug y B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, **145**, 169 (1983).
- 125F.J. Krug, E.A. Zagatto y H. Bergamin F<sup>o</sup>, *Anal. Chim. Acta*, **179**, 103 (1986).
- 126B.F. Reis, M.F. Giné. F.J. Krug y H.Bergamin F<sup>o</sup>, *J. Anal. At. Spectrom.*, **7**, 865 (1992).
- 127B.C.Erickson, J.Ruzicka y B.Kowalski, *Anal. Chem.*, **59**, 1246 (1987).
- 128 J.Ruzicka y E.Hansen, *Anal. Chim. Acta*, **145**, 1(1983).
- 129C.Riley, L.Aslett y J.Morgon, *Clin.Chem.*, **29**, 332 (1983).
- 130H.A.Mottola y A.Hanna, *Anal.Chim.Acta*, **100**, 167 (1978)).
- 131J.Ruzicka y E.Hansen, *Flow Injection Analysis*, 2a. Edición, J.Wiley & Sons, New York (1988).
- 132S.Olsen, J.Ruzicka y E.Hansen, *Anal.Chim.Acta*, **136**, 101 (1982).
- 133J.Ruzicka y E.Hansen, *Anal.Chim.Acta*, **145**, 1 (1983).
- 134J.Ruzicka, *Phil.Trans.Roy.Soc.London*, **5**, 645 (1982).
- 135D. Betteridge y B.Fields, *Anal. Chem.*, **50**, 654 (1978).
- 136J.T.Vanderslice, K.K.Stewart, A.G.Rosenfeld y J.Higgs, *Talanta*, **28**, 11 (1981).

- 137 H.L.Pardue y B.Fields, *Anal.Chim.Acta*, **124**, 39 (1981).
- 138 H.L.Pardue y B.Fields, *Anal.Chim.Acta*, **124**, 39 (1981).
- 139 C.C.Painton y H.A.Mottola, *Anal.Chim.Acta*, **154**, 1 (1983).
- 140 M.Valcarcel y M.D.Luque de Castro, *Flow Injection Analysis, Principles and Applications*, Ellis Horwood Limited, Chichester, (1987).
- 141 J.Ruzicka, E.Hansen y H.Mosbaek, *Anal.Chim.Acta*, **92**, 235 (1977).
- 142 A.U.Ramsing y E.Hansen, *Anal. Chim. Acta*, **129**, 1(1981).
- 143 G.Taylor, *Proc. R. Soc. London, Serie A*, **219**, 186 (1953).
- 144 J.T.Vanderslice, K.Stewart y A.Rosenfeld, *Talanta*, **28**, 11 (1981).
- 145 J.T.Vanderslice y A.G.Rosenfeld, *Anal.Chim.Acta*, **179**, 119 (1986).
- 146 A.Tijssen, *Anal.Chim.Acta*, **114**, 71 (1980).
- 147 J.Ruzicka y E.Hansen, *Anal.Chim.Acta*, **180**, 41 (1986).
- 148 J.Ruzicka, *Anal.Chim.Acta*, **190**, 165 (1986).
- 149 J.B. Stewart, J. Ruzicka y E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, **81**, 371, (1976).
- 150 D.Betteridge y B.Fields, *Anal.Chem.*, **50**, 654 (1978).
- 151 W.D.Basson y J.F.van Staden, *Analyst*, **103**, 897 (1978).
- 152 K.Yoshimura, *Analyst*, **113**, 471 (1988).
- 153 M. Agudo, A. Ríos y M. Valcarcel, *Anal.Chem. (Technical Notes)*, **65**, 2941, (1993).
- 154 M.Valcarcel y M. D. Luque de Castro, *Analyst*, **118**, 593 (1993).
- 155 S. Caroli, A. Alimonti, F. Petrucci y Z. Horvath, *Anal.Chim.Acta*, **248**, 241 (1991).
- 156 W.J.Youden, in *Treatise on Analytical Chemistry, Theory and Practice*, Vol.1, Parte 1, Ed. I.M.Kolthoff y P.J.Elving, Interscience, (1978).
- 157 L.A.Fernando, W.D.Heavner y C.C.Gabrielli, *Anal.Chem.*, **58**, 511 (1986).
- 158 F.Smith, B.Cousins, J.Bozic y W.Floria, *Anal. Chim. Acta*, **177**, 243 (1985).

- 159R.W.Dabeka, A.Mykytiuk, S.S.Berman y D.S.Russell, *Anal. Chem.*, **48**(8), 1203, (1976).
- 160P. Torres, E. Ballesteros y M.D. Luque de Castro, *Pittsburgh Conference*, Chicago, USA, (1994).
- 161R.E. Sturgeon, S.S. Berman, A. Desaulniers y D.S. Russell, *Talanta*, **27**, 85 (1980).
- 162V.H.Gomiscek y B.Gorenc, *Anal.Chim.Acta*, **98**, 39 (1978).
- 163T.K. Jan y D.R. Young, *Anal. Chem.*, **50**, 1250 (1978).
- 164C.Fairless y A.J.Bard, *Anal.Chem.*, **45**, 2289 (1973).
- 165G.E.Batley y J.P.Matousek, *Anal.Chem.*, **29**, 2031 (1977).
- 166J.P.Riley y D.Taylor, *Anal.Chim.Acta*, **40**, 479 (1968).
- 167L.Friberg, G.F.Nordberg y V.B.Vouk, *Handbook on the Toxicology of Metals*, 2a. Edición, Elsevier, Amsterdam (1986).
- 168A.G.Cox y C.W.Mc.Leod, *Anal.Chim.Acta*, **179**, 487 (1986).
- 169T.Yamane y H.Mottola, *Anal.Chim.Acta*, **146**, 181 (1983).
- 170S.S.Jorgensen y M.A.B.Regitano, *Analyst*, **105**, 292 (1980).
- 171J.C.de Andrade, J.C.Rocha, C.Pasquini y N.Baccan, *Analyst*, **108**, 621, (1983).
- 172M.J.Whitaker, *Anal.Chim.Acta*, **174**, 375 (1985).
- 173P. Cazeneuve, *Bull.Soc.Chim.*, **23**, 701 (1900).
- 174R.T. Pflaum y L.Howick, *JACS*, **78**, 4862 (1956).
- 175E.B.Sandell, *Colorimetric Determination of Traces of Metals*, 2da. Edición, Interscience Publishers, New York, (1956).
- 176J.C.de Andrade, J.C.Rocha y N.Baccan, *Analyst*, **110**, 197 (1985).
- 177W.Wang, *Anal.Chim.Acta*, **119**, 157 (1980).
- 178K.Johnson y R.Petty, *Anal.Chem.*, **54**, 1185 (1982).
- 179J.F. Tyson, *Quim.Anal.*, **8**, 171 (1989).
- 180J.F. Tyson, *Analyst*, **115**, 587 (1990).

- 181 S.J. Chalk y J.F. Tyson, *Anal. Chem.*, **66**, 660 (1994).
- 182 J.O. Muse, M.B. Tudino, L.d'Huicque, O. Troccoli y C. Carducci, *Env. Poll.*, **87**, 249 (1995).
- 183 D.C. Manning y W. Slavin, *Anal. Chem.*, **51**, 2375 (1979).
- 184 A. Carisano en *Aplicazioni dell' ETA-AAS Zeeman nel Laboratorio Chimico e Tossicologico*, Vol. I, C. Minoia y S. Caroli editores, Edición Librería Cortina, Padova, (1989).
- 185 T.W. May y W. Brumbaugh, *Anal. Chem.*, **54**, 1032 (1982).
- 186 M. Bettinelli, U. Baroni y N. Pastorelli en *Aplicazioni dell' ETA-AAS Zeeman nel Laboratorio Chimico e Tossicologico*, Vol. I, C. Minoia y S. Caroli editores, Edición Librería Cortina, Padova, (1989).
- 187 B. Welz, *J. Atom. Abs. Spectrom.*, **2**, 793 (1987).
- 188 D.L. Styris y D.A. Redfield, *Spectrochim. Acta Rev.*, **15**, 71 (1992).
- 189 J. Komarek, L. Sommer, K. Dittrich, *Scr.-Chem.*, **21**, 23 (1991), *Chem. Abstr.*, **119**, 19316 (1993).
- 190 P. Yang, Z. Ni, Z. Zhuang, F. Xu y A. Jiang, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **7**, 515 (1992).
- 191 R.E. Sturgeon y S.N. Willie, *J. Anal. Atom. Spectrom.* **7**, 339 (1992).
- 192 R.W. Dabeka, *Anal. Chem.*, **64**, 2419 (1992).
- 193 M.D. Luque de Castro y M.T. Tena, *Talanta*, **42**(2), 151 (1995).
- 194 M. Valcarcel y M.D. Luque de Castro, *Analyst*, **118**, 593 (1993).
- 195 S. Nakashima, R.E. Sturgeon, S.N. Willie y S.S. Berman, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **330**, 592 (1988).
- 196 M.R. Weaver y J.M. Harris, *Anal. Chem.*, **61**, 1001 (1989).

- 197B. Mohammad, A.M. Ure y D. Littlejohn, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **7**, 695 (1992)
- 198G.D.Marshall y J.F.van Staden, *J.Anal.Atom. Spectrom.*, **5**, 681 (1990).
- 199B.Welz, Y.He y M.Sperling, *Talanta*, **40(12)**, 1917 (1993).
- 200R.A.Day Jr. y A.L.Underwood, *Química Analítica Cuantitativa*, Prentice-Hall, Hispanoamericana, Mexico, (1989).
- 201H.I. Shuval y N. Gruener, *Am. J. Pub.Health*, **62**, 1045 (1972).
- 202I.A. Wolf y A.E. Wassermann, *Science*, **177**, 15 (1972).
- 203W.Stumm y J.J.Morgan, *Acquatic Chemistry*, 2a. Ed., Editorial J.Wiley & Sons, (1981).
- 204L.Sigg, W.Stumm y P.Behra, *Chimie des Millieux Aquatiques*, Ed.Masson, (1992).
- 205J.Atienza, M.Herrero, A.Maqueira y R.Purchades, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **22(5)**, 331 (1991).
- 206J.B. Mullin y J.P. Riley, *Anal.Chim.Acta*, **12**, 464 (1955).
- 207J.C.Colombo, E.Pelletier, Ch.Brochu, M.Khalil y J.A.Catoggio, *ES&T*, **23**, 888 (1989).
- 208C.Johns, S.N.Luoma y V.Elrod, *Estuarine, Coastal and Shelf Sci.*, **27**, 381 (1988).
- 209C.Johns y S.N.Luoma, *Sci.Tot. Environ.*, **97/98**, 673 (1990).
- 210J.E.Lingby y H.Brix, *Sci.Tot.Environ.*, **64**, 239 (1987)).
- 211S.N.Luoma y D.J.H.Phillips, *Mar.Poll.Bull.*, **19**, 413 (1988).
- 212S.N.Luoma, D.Cain y C.Johansson, *Hydrobiologia*, **129**, 109 (1985)).
- 213*Can.J.Chem.* **58**, 1253 (1980).
- 214K.Y.Chen y J.C.Morris, *ES&T*, **6**, 529 (1972).
- 215H.C.H.Hahne y W.Krontje, *J.Environ.Qual.*, **2**, 444 (1973).
- 216A.E.Martell, *Pure & Applied Chem.*, **44**, 81 (1975).

- 217 F.J. Stevenson, *Humus Chemistry*, J. Wiley & Sons, Interscience, New York, (1982).
- 218 S. Licht, G. Hodes y J. Manassen, *Inorg. Chem.*, **25**, 2486 (1986).
- 219 I.A. Droppo y C. Jaskot, *ES&T*, **29**, 161 (1995).
- 220 L.A. Warren y A.P. Zimmerman, *Water Research*, **28**, 1921 (1994).
- 221 U. Forstner y A. Carstens, *Env. Technol. Letters*, **10**, 823 (1989).
- 222 W. Lietz y G. Gallig, *Water Research*, **23**, 247 (1989).
- 223 P. Guilizzoni, *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, **32**, 313 (1975).
- 224 R. Donazzolo, A. Orio. B. Pavoni y G. Perin, *Oceanol. Acta*, **7**, 1984 (1987).
- 225 B.V.L'vov, *Spectrochim. Acta*, **44B**, 1257 (1989).
- 226 B.V.L'vov, *Anal. Atom. Spectrom.*, **5**, 163 (1990).
- 227 K.E. Anders Ohlsson, *Spectrochim. Acta*, **47B**, 1341, (1992).
- 228 B.L'vov, *Spectrochim. Acta*, **47B**, 209 (1992).
- 229 S. Lynch, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **5**, 311 (1990).
- 230 R. Fonseca, *Spectrochim. Acta*, **45B**, 1527 (1990).
- 231 B.V.L'vov, *Spectrochim. Acta*, **33B**, 153 (1978).
- 232 B. Welz, *Analyst*, **110**, 459 (1985).
- 233 B. Welz, *Anal. Chem.*, **51**, 2567 (1988).
- 234 K. Jackson, *Spectrochim. Acta*, **46B**, 1841 (1991).
- 235 A. Henriksen y A.R. Selmer-Olsen, *Analyst*, **95**, 514 (1970).

*El poema "El Hombre y el Agua" es de Joan Manuel Serrat.*